

Adenoviren als tumorselektive Agentien - Verbesserung durch Mutationen?



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

von

URS DOMINIK HOBOM

aus Freiburg i. Br.

Baden-Württemberg

Marburg (Lahn) im Dezember 2003

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: 13.01.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed Marahiel
Zweitgutachter: HD. Dr. Matthias Dobbelsstein

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2004

Erklärung (Versicherung an Eides statt):

Ich versichere, daß ich meine Dissertation 'Adenoviren als tumorselektive Agentien: Verbesserung durch Mutation?' selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Hierbei habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich als Quellen genannten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 12.01.2004

Urs Hobom

0. Inhaltsverzeichnis:

0. Inhaltsverzeichnis	Seite 3
1. Zusammenfassung	Seite 6
1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache.....	Seite 6
1.2. englische Zusammenfassung.....	Seite 7
2. Einleitung	Seite 8
2.1. Hintergrund.....	Seite 8
2.2.. Aufgabenstellung.....	Seite 20
3. Materialien	Seite 22
3.1. Zelllinien.....	Seite 22
3.2. Antikörper.....	Seite 22
3.3. Plasmide.....	Seite 23
3.4. Puffer, Lösungen.....	Seite 24
3.5. Oligonukleotide.....	Seite 25
3.6. Viren.....	Seite 26
4. Methoden	Seite 28
4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	Seite 28
4.2. Western-Blotting-Verfahren.....	Seite 28
4.3. Immunodetektion von Proteinen.....	Seite 28
4.4. Immunfluoreszenz.....	Seite 29
4.5. Klonierung von Plasmiden.....	Seite 29
4.6. DNA-Präparation aus E. coli.....	Seite 30
4.7. DNA-Präparation aus menschlichen Zellen.....	Seite 30
4.8. Semi-quantitative RT-PCR zur RNA-Quantifizierung.....	Seite 31
4.9. Quick-Change Mutagenese von Plasmiden.....	Seite 31
4.10. Herstellung rekombinanter Viren.....	Seite 32
4.11. Herstellung elektrokompenter BJ5183 Bakterien.....	Seite 33
4.12. Transiente Transfektion von Zellen.....	Seite 33
4.13. Infektion von Zellen.....	Seite 34
4.14. Luziferase-Assay.....	Seite 34
4.15. DNA-Sequenzierung.....	Seite 34
4.16. Transkriptom-Analyse mit DNA-Micro-Array.....	Seite 35
5. Ergebnisse	Seite 36
5.1. Adenovirusinfektion führt zu einer Inhibierung, der Relokalisation und dem Abbau des zellulären Trans- kriptionsfaktors p53.....	Seite 36
5.2. Eine Punktmutante von E1B-55k ist nicht mehr in der Lage, p53 zu inhibieren.....	Seite 39

5.3. Trotz massiver Akkumulation von endogenem p53 in den Ad E1B-55k R239A infizierten Zellen bleibt das p53 transkriptionell inaktiv.....	Seite 41
5.4. In Gegenwart von singular exprimiertem E1B-55k R239A ist p53 transkriptionell aktiv, doch gilt dies nicht im Kontext einer viralen Infektion.....	Seite 43
5.5. Eine Punktmutation reduziert die inhibitorische Wirkung von E1A auf die transkriptionelle Induktion von p53 Zielgenen.....	Seite 46
5.6. Eine residuäre Bindung des mutierten E1B-55k R239A an p53 kann - soweit vorhanden - nicht für die transkriptionelle Inaktivität des endogenen p53 verantwortlich gemacht werden.....	Seite 50
5.7. Die aktivierende Phosphorylierung von p53 wird im Rahmen einer Adenovirusinfektion nicht beeinträchtigt.....	Seite 52
5.8. Eine kompetitive Absättigung der p53-Bindestellen durch p73 ΔN scheidet als Erklärungsmöglichkeit für die transkriptionelle Stille von p53 aus.....	Seite 53
5.9. Eine Relokalisation des p53 in den virusinfizierten Zellen kann nicht für die transkriptionelle Inaktivität von p53 verantwortlich gemacht werden.....	Seite 55
5.10. Die zusätzliche Deletion des antiapoptotischen Proteins E1B-19k aus dem viralen Genom führt zu einer verstärkten Apoptose in den virusinfizierten Zellen.....	Seite 57
5.11. Die Deletion der p400-Bindung aus der Primärsequenz von E1A führt zu einer weitestgehenden Wiederherstellung der transkriptionellen Aktivität von p53 in <i>in vitro</i> Reporter-gen-Assays.....	Seite 61
5.12. Trotz vermehrter Apoptose in den Ad Δ E1B-19k E1B-55k.R239A-infizierten Zellen führt dies nicht zu einer Verminderung der Virusaussaat.....	Seite 65
5.13. Auch in Gegenwart einer nicht abbaubaren Variante des p53 läßt sich kein Einfluß des überexprimierten p53 Proteins auf die Virusreplikation feststellen.....	Seite 67
5.14. Trotz massiver Apoptose in den p53mt24-28-exprimierenden und Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen stellt sich keine Benachteiligung im Viruswachstum ein.....	Seite 71
6. Diskussion.....	Seite 76
7. Anhang.....	Seite 88
7.1. Zusammenfassung.....	Seite 88
7.2. Summary.....	Seite 88
7.3. Einleitung.....	Seite 89
7.4. Aufgabenstellung.....	Seite 91

7.5. Ergebnisse.....	Seite 93
7.5.1. Die An- oder Abwesenheit von E4 orf3 zeigt bei Analyse eines cDNA-Arrays der ersten Generation keinen Einfluß auf die Transkription zellulärer Gene.....	Seite 93
7.5.2. Nach Interferon- γ Behandlung gehen Ad E4 inorf3-infizierte Zellen in Apoptose.....	Seite 95
7.5.3. Fas-Ligand und Tumornekrosefaktor- α haben keinen Einfluß auf wt-Adenovirus-infizierte Zellen, während sie Ad E4inorf3-infizierte massiv schädi- gen.....	Seite 97
7.5.4. Durch ektope Expression von E4 orf3 ist es nicht möglich, den Phänotyp Ad E4inorf3-infizierter Zellen zu revertieren.....	Seite 99
7.5.5. Die Deletions-Insertionsmutante Ad dl309 zeigt in Gegenwart von TNF- α und FasL einen Apop- tose-Phänotyp, der identisch zu dem Ad E4 inorf3-infizierter Zellen ist.....	Seite 101
7.6. Diskussion.....	Seite 107
8. Literaturverzeichnis.....	Seite 110
9. Lebenslauf.....	Seite 134
10. Danksagung.....	Seite 137

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Das adenovirale Oncoprotein E1B-55k bindet und antagonisiert p53, ein zelluläres Tumorsuppressorprotein. Jüngst ist eine Punktmutante von E1B-55k beschrieben worden, E1B-55k R239A, welche nicht mehr an p53 zu binden vermag. In Folge dessen akkumuliert p53 unkontrolliert in Zellen, die mit einem solchen Ad E1B-55k R239A Virus infiziert wurden. Diese Arbeit zeigt, daß, obwohl p53 in den virusinfizierten Zellen akkumuliert, es nicht zu einer Induktion der p53 Zielgene kommt. Im Gegensatz zu wt-E1B-55k war E1B-55k R239A, wenn es mit einem weiteren Kofaktor, der Ubiquitintransferase E4 orf6, komplettiert wurde, in Transfektionsversuchen nicht mehr in der Lage, p53 zu destabilisieren und abzubauen. Da in den Reportergenversuchen auch in Gegenwart von E1B-55k R239A und E4 orf6 p53-vermittelte Transgenexpression noch möglich war, mußte in den infizierten Zellen ein weiterer viraler Faktor für die Inaktivität von p53 verantwortlich sein. In Transfektionsversuchen zeigen Deletionen der p300- und der p400-Bindestellen aus der Primärsequenz von E1A eine deutliche Steigerung der transkriptionellen Aktivität von p53. Diese zusätzlichen Deletionen sind in Rahmen einer Adenovirusinfektion jedoch nicht ausreichend, um die p53-Transaktivierung wieder herzustellen. Ein weiterer viraler p53-Antagonist ist E1B-19k. Wird er deletiert, so gehen die infizierten Zellen auch dann noch vermehrt in Apoptose, wenn eine p53-vermittelte Transgenexpression gar nicht stattfindet. Verwendet man eine E1B-resistente Variante von p53, p53mt24-28, so ist die Apoptose, die nur in Abwesenheit von E1B-19k beobachtet wird, ungleich heftiger. Doch trotz dieser Apoptose kommt es zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung der Virusreplikation. Adenoviren haben multiple Möglichkeiten, auch in Ad Δ E1B-55k-infizierten Zellen die Expression der p53 Zielgene zu verhindern. Der tumorselektive Mechanismus, der solchen Viren zugeschrieben wird, scheint also nicht auf p53-Aktivität zu beruhen.

1.2. Abstract

The adenoviral oncoprotein E1B-55k binds and antagonizes the tumor suppressor protein p53. Recently, a point mutant of E1B-55k has been described, E1B-55k R239A, that no longer binds to p53, and cells that have been infected with Ad E1B-55k R239A accumulate endogenous p53. Here, we show that despite the accumulation of p53 in E1B-mutant adenovirus infected cells, no induction of p53 target genes can be detected. In transfection experiments, when completed with the ubiquitintransferase E4 orf6, and contrary to the results obtained with wt-E1B-55k, E1B-55k R239A still allows for induction of a p53-responsive reporter gene. E1B-55k R239A when combined with E4 orf6 does not degrade p53. Both p300 and p400 are histone acetyltransferases that are required for efficient p53-induced transgene expression. Although the elimination of p300, and even more strongly the elimination of p400 binding from E1A causes alleviation of p53 repression in reporter gene assays, both mutations are not sufficient to restore p53 target gene expression in the context of E1B-55k R239A mutant adenovirus infected cells. Adenovirus codes for another viral p53-antagonist, E1B-19k, which prevents p53-mediated apoptosis. Despite the lack of p53 transcriptional activity, enhanced apoptosis is observed in Ad E1B-55k R239A Δ E1B-19k infected cells, suggesting transcription independent routes to apoptosis. Also, in the presence of an E1B-resistant p53 variant, p53mt24-28, cells infected with a virus lacking E1B-19k selectively undergo apoptosis. However, despite the apoptosis observed, virus replication efficiency is only mildly compromised. Adenovirus possesses multiple ways of interfering with p53 activity although adenovirus replication is obviously not abolished by p53.

2. Einleitung

2.1. Hintergrund:

Das Gen für das Tumorsuppressorprotein p53 ist das in Tumoren am häufigsten mutiert vorliegende Gen (Fearon et al., 1987, Nigro et al., 1989, Hollstein et al., 1991). p53 scheint damit für die Tumorentstehung eine zentrale Rolle einzunehmen. Zumindest hat dies TP53 den Ruf eingebracht, als Wächter des Genoms zu agieren (D. Lane, 1992). Unter einer Reihe von Störsituationen, nur eine hiervon sind DNA-Schäden, kommt es zu einer Akkumulation bzw. einer Stabilisierung von p53 in den betroffenen Zellen (Prives et al., 1999). Man beobachtet zwei mögliche Ausgänge für solche Situationen: p53 ist in der Lage, den Zellzyklus anzuhalten. Dies soll der Zelle Zeit geben, die aufgetretenen DNA-Schäden selbständig zu beheben. Andererseits kann p53 auch die Expression von DNA-Reparaturenzymen induzieren (Kastan et al., 1992, A. J. Levine, 1997). Gleichzeitig ist p53 selber ein direkter Bestandteil eines solchen DNA-Reparaturkomplexes, der Einzelstrangbrüche beheben kann (Wang et al., 1995, Linke et al., 2003). Sind die aufgetretenen DNA-Schäden so umfangreich, daß eine Reparatur nicht mehr möglich erscheint, macht es für einen vielzelligen Organismus durchaus Sinn, einzelne Zellen in den Zelltod zu schicken. Auf diese Art und Weise werden die irreparablen DNA-Schäden nicht auf die Tochterzellen übertragen, die Stabilität und Uniformität der zellulären Genome im Gesamtorganismus bleibt erhalten. Auch für diesen zweiten Ausgang der Situation nach DNA-Schädigung ist p53 zuständig. Akkumuliert p53 über einen längeren Zeitraum, so kann p53 die Apoptose auslösen (Yonish-Rouach et al., 1991, Lowe et al., 1993a, Lowe et al., 1993b, Debbas et al., 1993). Bei der Entscheidung zwischen Reparatur und Zelltod spielt p21^{Cip1/WAF1} die entscheidende Rolle. Sind die aufgetretenen Schäden so umfangreich, daß p53 p21 nicht mehr induzieren kann, so entscheidet sich die Zelle für die Selbstauflösung (Gorospe et al., 1997, Bulavin et al., 1999, Mahyar-Roemer et al., 2001, Seoane et al., 2002, Oren et al., 2003, Rao et al., 1992, Debbas et al., 1993, Chiou et al., 1997, Thomas et al., 1998, Chattopadhyay et al., 2001).

p53 ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (Kern et al., 1991, Fields et al., 1990, Raycroft et al., 1990, Vogelstein et al., 1992, Yew et al., 1992, El-Deiry et al., 1993). Beide Wirkmechanismen von p53 - das Anhalten des Zellzyklus und, erforderlichenfalls, die Selbstaufgabe der Zelle über Apoptose – erfolgen, indem p53 an seine spezifischen DNA-Erkennungssequenzen bindet (A. J. Levine, 1997). Dies führt zur vermehrten Transkription der nahegelegenen, p53-induzierbaren Gene (El-Deiry et al., 1992, Zambetti et al., 1992, Raycroft et al., 1990, Kern 1992, Funk et al., 1992). Damit p53 an DNA binden kann, muß es als Homotetrameres vorliegen (Friedman et al., 1993, McLure et al., 1998). Erst in dem Homotetramer klappen in einer weitreichenden Konformationsänderung N- und C-Termini des p53 auf und legen die zentrale DNA-bindende Domäne frei (Halazonetis et al., 1993, Cho et al., 1994, Jeffrey et al., 1995). Was eine solche Homotetramerisierung begünstigt, ist nicht klar. Man weiß aber, daß eine Heterotetramerisierung mit mutiertem p53 die DNA-Bindung von p53 verhindert (Raycroft et al., 1990, Kern et al., 1992, Bargonetti et al., 1991). In den Tumorzellen, in denen p53 mutiert ist - bei mehr als 50% aller Tumoren ist dies der Fall - kann p53 nicht mehr an DNA binden. Als Konsequenz davon findet in Tumorzellen eine p53-vermittelte Transkription nicht mehr statt. Interessanterweise ist es hierbei bereits ausreichend, wenn nur ein p53 Allel (von in menschlichen Zellen insgesamt zwei Allelen) an bestimmten Aminosäuren mutiert ist, um die Tetramerisierung von p53 zu verhindern. Dieses eine mutierte p53-Allel ist also dominant-negativ (Milner et al., 1991, Bischoff et al., 1991, Bargonetti et al., 1992, Kern et al., 1992, Srivastava et al., 1993, Bond et al., 1994, Chene 1999).

Tatsächlich findet man in Tumorzellen nur selten eine Deletion von *TP53*. Auch Verkürzungsmutanten von p53 kommen so gut wie nicht vor. Obwohl zur bloßen Inaktivierung von p53 die Mutation einer Aminosäure zu einem Stop-Codon mit ähnlicher Häufigkeit auftreten sollte wie die Mutation einer Aminosäure in eine andere, verwandte Aminosäure (also eine Aminosäure, die nur durch *eine* Basenaustauschmutation erreichbar ist), tritt die Mutation zu einem Stop-Codon nicht auf. Dies hat zu der Hypothese eines gain-of-function für das mutierte volle Länge-p53 geführt (Eliyahu et al., 1985, Dittmer et al., 1993, Harvey et al., 1995, Gualberto et al., 1998, K. Roemer, 1999). Nur, wenn das

(typischerweise an den exponierten Seitenketten der zentralen DNA-bindenden Domäne) mutierte p53 noch über eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne verfügt, kann es mit den von dem zweiten *TP53*-Allel kodierten wildtypischen Versionen von p53 heteromerisieren (Baker et al., 1989, Hollstein et al., 1996, Cho et al., 1994, Greenblatt et al., 1994, I. Herskovitz, 1987, Bargonetti et al., 1992, Srivastava et al., 1993, Chene et al., 1999, Kern et al., 1992). Der gain-of-function besteht nun darin, daß bereits bestimmte (trans-dominant negative) Punktmutationen von p53 ausreichen, um auch das nicht mutierte p53 in die mutierte Konformation zu zwingen (Milner et al., 1991, Halazonetis et al., 1993, Finlay et al., 1988). In der besonderen Situation des p53 reicht also bereits die Punktmutation nur eines Allels aus, um auch das TP53, welches von dem anderen, noch intakten Allel kodiert wird, funktionell zu inaktivieren. Dieses wird in Heterooligomeren gebunden und davon abgehalten, als Homotetramer die p53-Zielgene zu aktivieren (Kern et al., 1992). Funktionell entsprechen diese ausgewählten, tumorerzeugenden p53 Punktmutationen auf nur *einem* p53 Allel also bereits dem p53 knock-out ($p53^{-/-}$). Darüberhinaus bietet das in den Zellen akkumulierende, mutierte p53 gegenüber dem knock-out noch den weiteren Vorteil, daß es über Heterooligomerisierung auch die engen Verwandten des p53, die homologen Transkriptionsfaktoren p73 und p63 gleich mit ausschalten kann (Wolf et al., 1984, Eliyahu et al., 1985, Di Como et al., 1999, Gaiddon et al., 2001, Marin et al., 2000, Strano et al., 2002). Somit kann deren überlappendes Set an Zielgenen den Ausfall des p53 funktionell nicht mehr komplementieren (Jost et al., 1997, Bian et al., 1997, Zeng et al., 1998, Strano et al., 2000).

Es gibt eine ganze Reihe von Genen, die durch p53 aktiviert werden können (A. J. Levine, 1997). Die wohl wichtigsten zwei Gene sind *p21/Cip-1/WAF1* so wie *Mdm-2*. p21 - die zwei anderen Namen stehen für cyclin-dependent kinase-inhibitor protein 1 sowie wild-type p53 activated factor 1 - besitzt zwei zentrale Funktionen. Dadurch, daß p21 an Cyclin E/Cdk2-Komplexe bindet und hierdurch den Abbau von $p27^{Kip-1}$ verhindert, arretiert es die Zelle in G_1 (Sherr et al., 1999). p21-Induktion verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastoma-proteins, pRb. Solange pRb in seiner unterphosphorylierten Form bleibt, hält es den S-Phase-spezifischen Transkriptionsfaktor E2F gebunden. (Menschliche

Zellen kodieren für drei Retinoblastoma-Proteine und haben sechs verschiedene E2F Gene mit überlappenden, aber nicht identischen Funktionen. Die Regulierung der einzelnen Subtypen verläuft stets analog.) Das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein wirkt, über sein Herantitrieren von Histondeacetylasekomplexen, als Transkriptionsrepressor, der den E2F-vermittelten Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert.

Zwar kann E2F auch in Gegenwart von pRb mit seinem Partnermolekül DP interagieren, doch überwiegt die Transkriptionsrepressionseigenschaft solange pRb an E2F gebunden bleibt, so daß eine Induktion der E2F Zielgene nicht stattfindet (Brehm et al., 1999). E2F-vermittelte Genexpression wird mit dem Beginn der S-Phase gleichgesetzt und p21-Expression verhindert die hierzu notwendige inaktivierende Phosphorylierung von pRb. Interessanterweise vermag p21 zusätzlich auch an freies, also nicht an pRb gebundenes E2F zu binden und als Repressor der E2F-vermittelten Transkription zu wirken (Delavaine et al., 1999). Das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert die p21-Expression und kann so den Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindern. Da aber gleichfalls die Aktivität von p53 (teilweise) der Kontrolle durch E2F unterliegt, bildet sich eine autoregulatorische negative Rückkopplungsschleife, die normale Zellen stabil der G₀-Phase hält (Vogelstein et al., 2000).

Die Inaktivierung von p53 ist zwar notwendig, damit eine Zelle zu einer Tumorzelle wird, sie ist jedoch keinesfalls ausreichend. p53-Punktmutationen haben stets *nur* zur Folge, daß p53 nicht mehr an DNA binden kann und somit nicht mehr als transkriptioneller Aktivator des zentralen Schlüsselproteins p21/Cip-1/WAF1 auftreten kann. Es wird in den Zellen also lediglich die Fähigkeit zum G₁-Arrest aufgehoben (Harvey et al., 1991, Pietenpol et al., 1994). Zur vollen Transformation ist mindestens eine weitere Mutation erforderlich. Diese zweite Mutation muß die Zelle aktiv in die S-Phase schubsen. Sehr viele Mutationen oder Deletionen sind denkbar, doch stets wird es darauf hinauslaufen, den S-Phase-spezifischen Transkriptionsfaktor E2F zu aktivieren. Eine Möglichkeit hierzu ist die zusätzliche Deletion des pRb-Gens (in beiden Allelen!!), die mit einer hohen Häufigkeit auch tatsächlich beobachtet wird. Funktionell äquivalent zu einer pRb-Deletion sind Mutationen in dem *p16ink4a*-Lokus. Das Genpro-

dukt, p16, kodiert für ein Protein, welches an die cyclinabhängige Kinase-4 bindet und diese inhibiert. Cdk4 wiederum ist für die Phosphorylierung von pRb zuständig. Fehlt also der Inhibitor p16 ink4a, so kann cdk4 pRb unkontrolliert phosphorylieren. Hierdurch wird der pRb-vermittelte Wachstumsarrest aufgehoben (siehe oben) und das freigesetzte E2F versetzt die Zelle in S-Phase. pRb und p53 sind demnach sehr wichtige Genprodukte. Sind beide gleichzeitig funktionell inaktiv, entartet eine normale Zelle zu einer Tumorzelle.

DNA Tumoviren tun genau dies. Sie kodieren für Proteine, die sowohl pRb als auch p53 antagonisieren. Das wohl bekannteste DNA Tumovirus, auch weil es eine signifikante medizinische Bedrohung darstellt, ist das humane Papillomavirus. Befällt (infiziert) ein solches Papillomavirus Plattenepithelzellen der Cervix (Gebärmutterhalszellen), so werden diese zur Unsterblichkeit transformiert und es entsteht ein Tumor (Dürst et al., 1987, H. zur Hausen, 1994). Verantwortlich hierfür sind die beiden viralen Nichtstrukturproteine E6 und E7, die jeweils p53 und pRb abbauen bzw. antagonisieren (Werness et al., 1990, Scheffner et al., 1990, Phelps et al., 1988, Dyson et al., 1989). Allein durch diese zwei simplen Schritte - funktionelles Ausschalten von pRb und p53 - entartet eine normale Zelle zu einer Tumorzelle. War das die Intention des Virus? Nein, ein Virus möchte sich vermehren - und das am besten schnell -, zumindest jedoch bevor das Wirtsimmunsystem die Infektion der Zelle bemerkt hat und bekämpft. D. h., je ausgefeilter die Immunescape-Mechanismen eines Virus sind, desto mehr Zeit bleibt ihm für den Replikationszyklus in den infizierten Zellen. Tatsächlich korreliert die Replikationszeit von Influenza- (simpel, nur anti-innate-Immunsystem Effektoren) über Adeno- (mittlere Komplexität, inklusive Anti-Cytokin- und Anti-MHC-Waffensysteme) zu Herpesviren (Proteinantagonisten gegen alle vorgenannten antiviralen Effektoren, zusätzlich NK-Zell-Antagonisten) sehr gut mit ihren genetischen Fähigkeiten, sich zu verstecken. Die Transformation ist eher eine Nebenerscheinung, ein - allerdings notwendiges - Begleitprodukt in dem Bestreben des Virus, sich zu vermehren.

Um sich zu vermehren, sind DNA-Viren darauf angewiesen, die notwendigen Kofaktoren, wie etwa dNTP-Bausteine oder PCNA (proliferating cell nuclear antigen) als Hilfsprotein für die virale DNA-Polymerase, in den infizierten Zellen

vorzufinden. Hierzu müssen die Viren die infizierten Zellen dazu bringen, in die S-Phase zu gehen. Wie oben diskutiert, gelangt eine Zelle dann in die S-Phase, wenn die beiden Proteine, die die Zellen in G_1 halten, ausgeschaltet werden. Es handelt sich dabei um die beiden Tumorsuppressorproteine pRb und p53. Alle DNA-Viren müssen diese zwei Proteine inaktivieren. In der Regel kommt es jedoch allein dadurch noch nicht zu einer Krebsentstehung, weil das Virus nun in der Lage ist, einen lytischen Infektionsweg einzuschlagen. Im Verlauf dessen wird die infizierte Zelle nach Stunden oder auch erst nach Tagen zerstört und die Tochterviren werden freigesetzt. Dementsprechend können Adenoviren - sie verfügen mit E1A über einen pRb-Antagonisten (Bagchi et al., 1990) und mit E1B-55k über einen p53-Antagonisten (Yew et al., 1992) – ruhende menschliche Zellen zwar infizieren und diese von G_0 in die S-Phase bringen (woraufhin sie sich hierin replizieren), doch kommt es durch Adenovirusinfektion nicht zur Tumorentstehung. Nur wenn in dem normalen - lytischen - Infektionsweg etwas schief läuft, besteht die Chance zur Zelltransformation. Diese wird auch wahrgenommen, wenn die Voraussetzungen hierfür vorliegen.

Soweit die viralen p53- und pRb-Antagonisten nach wie vor p53 und pRb antagonisieren - Speziesbarrieren könnten dem entgegenstehen - und für den fehlenden Abschluß des produktiven Replikationszyklus des Virus ein wichtiger Grund vorliegt, kommt es zur Entartung (H. E. Ruley, 1983). Bei Adenoviren ist dies beispielsweise der Fall, wenn diese nicht-permissive Nagerzellen infizieren (Cook et al., 1979, Schrier et al., 1983, Bernards et al., 1983a, Cook et al., 1984, Kast et al., 1989). Adenoviren können natürlich auch menschliche Zellen transformieren, nur muß dort der Vollendung des replikativen Zyklus ein besonderer Grund entgegenstehen. Das Fehlen für den Replikationszyklus wichtiger Proteine in mutanten Adenovirusgenomen ist solch eine notwendige Voraussetzung. Engt man über Deletionen des Adenovirusgenoms den Bereich, der für die Transformation menschlicher Zellen mindestens notwendig ist, immer weiter ein, so endet man schließlich mit einem kleinen Fragment aus dem linken Ende des Adenovirusgenoms (map units 0,4 bis 11,2) (Graham et al., 1974, van der Elsen et al., 1982, Chinnadurai, 1983). Interessanterweise kodiert dieser DNA-Abschnitt genau für die beiden viralen Proteine E1A und E1B-55k, die Antagonisten zu pRb und p53.

Daß tatsächlich nur der pRb und p53-Antagonismus für die Transformation notwendig sind, kann man zeigen, indem man wahlweise die Proteine E1A oder E1B durch andere bekannte pRb und p53-Antagonisten ersetzt. Beispielsweise kann man konstitutiv aktives myc mit mutiertem p53 kombinieren, und man erhält Transformation (Jenkins et al., 1984, Mowat et al., 1985). Selbst chimäre Moleküle zusammengesetzt aus E1A-Fragmenten und myc-Mutanten rekonstituieren die Zellentartung (R. Ralston, 1991, Deleu et al., 2001). Andererseits ergibt E1A mit ras kombiniert ebenfalls Transformation (H. E. Ruley, 1983, Phelps et al., 1988). Ras ist ein p53-Antagonist. Mutiertes, also konstitutiv aktives ras kann nicht mehr die Transkription der D-Typ Cycline unterstützen. Gleichzeitig führt eine unregulierte Aktivität der ras-abhängigen Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) zu einer Phosphorylierung der D-Typ Cycline, weil PI3K Akt, einen negativen Regulator der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) inaktivierend phosphoryliert (Diehl et al., 1998). Die nunmehr stattfindende Phosphorylierung der D-Typ Cycline führt zu deren Destabilisierung und Abbau. Die inaktivierende Phosphorylierung des S-Phase-Inhibitors pRb - hierfür werden die D-Typ Cycline benötigt - wird bei ras Mutation also auf zweierlei Wegen unterbunden (Sherr et al., 1999). Normalerweise wird pRb von der cyclin-abhängigen Kinase-4 phosphoryliert, welche zusammen mit p21^{cip-1/WAF1} und den D-Typ Cyclinen in einem Komplex vorliegt. Durch den Abbau des Cyclins zerfällt der Komplex und p21 wird freigesetzt (LaBaer et al., 1997, Hall et al., 1995, Cheng et al., 1999).

Freigesetztes p21 kann nun an die E-Typ Cycline und die cyclin-abhängige Kinase-2 binden und so die autostimulatorische Phosphorylierung von pRb wirkungsvoll verhindern (Sherr et al., 1999). Da auf der anderen Seite p21 aber ein notwendiger Bestandteil des Cyclin-D/Cdk 4-Komplexes, der die initiale pRb-Phosphorylierung bewirkt, ist, erklärt dies auch, warum der - eigentlich naheliegende - p21 Gen-knock-out in der Natur nicht vorkommt (Shiohara et al., 1997). Das p21 Protein wird physisch sowohl für die Inhibition als auch die Aktivierung der Zellteilung benötigt. Den funktionellen p21 knock-out kann man aber erhalten, indem man die Aktivierung von p21 zum Zwecke des Zellzyklus-arrest ausschaltet. Dies erreicht man - oder die Natur - indem der transkription-

nelle Aktivator von p21 - nämlich das Tumorsuppressorprotein p53 - in einer Art und Weise mutiert wird, so daß es die Induktion des *p21* Gens nicht mehr bewirken kann (siehe oben). p21 liegt aber nach wie vor physisch in den Zellen in einem Komplex mit cyclin-D/cdk 4 vor. Dort wird es auch gebraucht, um - in Abhängigkeit von fötalem Kälberserum - den Eintritt der Zelle in die S-Phase (über die pRb-Phosphorylierung) zu vermitteln.

Die Zelltransformation durch DNA Tumoviren konnte man als abortive Infektion betrachten (siehe oben). Tumorzellen jedoch sind bereits transformiert, sie befinden sich quasi dauerhaft im Zellzyklus, so daß der virusvermittelte Eintritt in die S-Phase gar nicht mehr unbedingt notwendig ist. Man könnte also argumentieren, daß Viren, die solche bereits entarteten Zellen befallen, gar nicht mehr darauf angewiesen sind, ihre p53- und pRb-Antagonisten mitzubringen. In den Zielzellen sind pRb und p53 ja bereits mutiert. Das heißt auf der anderen Seite aber auch, man könnte zur Infektion solcher Tumorzellen Virusmutanten verwenden, bei denen die viralen p53- und/oder pRb-Antagonisten deletiert sind. Genau dies war das Konzept von Bischoff et al. (Bischoff et al., 1996). Er hat als erster berichtet, daß sich ein Adenovirus, dem man seinen p53-Antagonisten E1B-55k deletiert hat, selektiv nur auf solchen Zellen vermehrt, die kein funktionelles p53 mehr besitzen, also auf Tumorzellen. Auf den umgebenden normalen Zellen hingegen war diese Adenovirusmutante in ihrer Replikationsfähigkeit nicht gehemmt. Ursächlich beteiligt hieran war das Fehlen des viralen p53-Antagonisten, E1B-55k, in den Genomen der adenoviralen Deletionsmutanten. Dies führte zu dem Konzept des selektiv onkolytischen Virus (Bischoff et al., 1996), denn diese Deletionsmutanten konnte man möglicherweise zur Tumorthherapie einsetzen. Vermehren kann sich solch ein Virus nur in Zellen, die selbständig in die S-Phase gelangen - diese werden durch die Virusreplikation dann schließlich lysiert - wohingegen das ebenfalls infizierte Normalgewebe nur abortiv infiziert wird.

Kann man also unter Verwendung solcher onkolytischer Viren eine Regression selektiv nur des entarteten Zellklons, der Tumormasse, herbeiführen? Diese Frage ist nicht unumstritten. Klar ist, daß sich Onxy-Pharmaceuticals mit diesem E1B-55k-deletierten Virus gegenwärtig in Phase III einer klinischen Studie

zur Therapie des besonders schwer operablen Kopf- und Halskrebses befindet. Die bisherigen Phase I und Phase II Studien waren außerordentlich vielversprechend (Kirn et al., 1998, Ganly et al., 2000, Khuri et al., 2000, Lamont et al., 2000, Neumanias et al., 2000). Insbesondere wenn p53 gleichzeitig stimuliert wurde - über γ -Bestrahlung, Induktion von DNA-Schäden durch Chemikalien - konnte die Effektivität des attenuierten, tumorselektiven Adenovirus noch weiter gesteigert werden (Heise et al., 1997, Heise et al., 2000b, Rogulski et al., 2000, You et al., 2000). Das Konzept dieses p53-selektiven E1B-defizienten Adenovirus scheint in der Praxis so erfolgreich, daß seine Anwendung inzwischen auch für andere Krebsarten erprobt wird (Vasey et al., 2000, Reid et al., 2000, Hecht et al., 2000, Heise et al., 2000a, Habib et al., 2001).

Gleichwohl gibt es eine Forschergemeinde, die die Wirksamkeit dieses E1B-losen Adenovirus im allgemeinen, und die Abhängigkeit seiner selektiven Replikationsfähigkeiten von dem p53-Status der infizierten Zellen im besonderen, in Zweifel ziehen. Verschiedene Forscher hatten gefunden, daß die Replikation dieses E1B-deletierten Adenovirus - auch bekannt unter dem Namen ONYX-015 - unabhängig von dem p53 Status der infizierten Zellen sein soll (Rothman et al. 1998, Turnell et al., 1999). In diesen beiden Studien wurden p53 positive ($p53^{+/+}$, keine p53 Mutationen) Tumorzellen mit anderen Tumorzellen verglichen, die kein funktionelles p53 mehr aufweisen ($p53^{-/-}$ oder $p53^{mut/+}$). Funktionelles und wildtypisch-reguliertes p53 ist in Tumorzellen aber nicht erlaubt (siehe oben). Da p53 selber aber nur in 50% aller Tumorzellen mutiert ist, stellt sich die Frage, was mit den anderen 50% ist - offenbar ist funktionelles p53 ja auch nicht verboten. Vielfach wird für Tumorzellen beobachtet, daß sie - obwohl genotypisch $p53^{+/+}$ - aufgrund anderer Mutationen im p53-Regelkreislauf dennoch nicht über ein vollwertiges p53 verfügen.

Mdm-2 ist ein wichtiger negativer Regulator von p53. Ganz analog wie das adenovirale Onkoprotein E1B-55k bindet Mdm-2 an den N-Terminus von p53 (tatsächlich binden beide sogar an die gleichen Aminosäuren 22/23) (Lin et al., 1994). Mdm-2 ist - wiederum wie E1B-55k - eine E3-Ubiquitinligase, welche spezifisch für p53 ist (Honda et al., 1997, Haupt et al., 1997b, Kubbutat et al., 1997, Querido et al., 1997, Steegenga et al., 1998, Momand et al., 2000).

Funktionelles Mdm-2 inaktiviert p53 durch Bindung an p53 Tetramere und destabilisiert p53, indem es p53 für den proteasomalen Abbau markiert (Marston et al., 1995, Kubbutat et al., 1998, Fang et al., 2000). In manchen transformierten Zellen - besonders in Osteosarcomen - wird die Inaktivierung von p53, unter Beibehaltung des p53^{+/+} Genotyps, erreicht, indem es zu einer Multimerisierung der Genkopienzahl des *MDM2* Gens kommt (Oliner et al., 1992). Der funktionelle p53 knock-out wird hier also über die Überexpression des p53-Antagonisten Mdm-2 erreicht. Die gegebenenfalls gebotene Akkumulation von p53 - nach γ -Bestrahlung, nach Endoreduplikation - und der notwendige, p21-vermittelte Zellzyklusarrest kann in diesen Zellen auch in Gegenwart des nicht mutierten *TP53* Gens nicht mehr stattfinden.

Interessanterweise ist Mdm-2 selbst ein Zielgen p53-vermittelter Transkriptionsaktivierung (Barak et al., 1993). Hierdurch wird eine negative Rückkopplungsschleife etabliert (Wu et al., 1993). p53 aktiviert seinen eigenen negativen Regulator, Mdm-2 (Momand et al., 1992). Dieses Mdm-2 ist ein Molekül, welches eingehende Reize integriert. Z. B. kann es nach DNA-Schäden an verschiedenen Stellen phosphoryliert werden, wodurch seine Fähigkeit, p53 zu ubiquitinieren, gehemmt wird (Khosravi et al., 1999, Mayo et al., 1997). Mit Hilfe dieses sensitiven Regelkreislafs wird - über den eigentlichen Master Regulator Mdm-2 - die Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 jeweils nur dann zugelassen, wenn die Interaktion von p53 mit Mdm-2 gestört ist (Momand et al., 2000, Shieh et al., 1997). Weitere posttranslationale Modifikationen des Mdm-2 - z. B. Acetylierungen und Sumoylierungen - tragen zur Feinjustierung von Mdm-2 bei, in Abhängigkeit derer Mdm-2 entweder sich selbst oder p53 ubiquitiniert (Fang et al., 2000, Buschmann et al., 2000). Mdm-2 entscheidet also darüber, ob p53 als Transkriptionsaktivator von p21 wirken und dadurch den Zellzyklusarrest herbeiführen kann oder nicht.

Der p53-Antagonist Mdm-2 unterliegt der Kontrolle durch einen negativen Regulator der Mdm-2-Aktivität, p14^{ARF} (Quelle et al., 1995, Brown et al., 1998, Zhang et al., 1998, Zhang et al., 1999). Dieser Antagonist des p53-Antagonisten Mdm-2 ist somit ein p53 Agonist (Stott et al., 1998, Pommerantz et al.,

1998, Kamijo et al., 1998, Honda et al., 1999). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, bei denen in Tumorzellen der $p53^{+/+}$ Genotyp vorliegt, ist $p14^{ARF}$ entweder mutiert (nicht deletiert, da ein überlappender Leserahmen für das wichtige Genprodukt $p15^{ink4a}$ kodiert) oder durch Hypermethylierung des $p14^{ARF}$ -Promotors stillgelegt (Esteller et al., 2001). In Kenntnis dieser Tatsachen erscheinen die Studien von Rothmann et al. und Turnell et al. (Rothmann et al., 1998, Turnell et al., 1999) nun plötzlich in einem anderen Licht. Die Unmöglichkeit der Autoren, die Ergebnisse von Bischoff et al. (Bischoff et al., 1996) zu reproduzieren, ließ sich ganz elegant über den mutierten $p14^{ARF}$ Status der verwendeten $p53$ -positiven Tumorzelllinien erklären (Ries et al., 2000). Verwendete man stattdessen eine Tumorzelllinie die sowohl $p53$ -positiv als auch $p14^{ARF}$ wild-typisch war, konnte die Selektivität des E1B-55k-deletierten Adenovirus, ONYX-015, wieder hergestellt werden (Ries et al., 2000). Diese Arbeit ist in der Fachwelt jedoch nicht unumstritten, vereinzelt wurde ihr bereits widersprochen (Dix et al., 2001, Edwards et al., 2002). All dies wirft aber doch die Frage auf: Was ist denn nun die Rolle von $p53$ während der Adenovirusinfektion?

Klar ist, daß Adenoviren $p53$ in den infizierten Zellen abbauen (Grand et al., 1994, Steegenga et al., 1998). Hierfür ist, in Kooperation mit E4 orf6, das frühe adenovirale Genprodukt E1B-55k verantwortlich, welches direkt an $p53$ bindet (Sarnow et al., 1982a, Querido et al., 1997). Durch Mutation derjenigen Aminosäuren von $p53$, welche direkt mit E1B-55k interagieren (Kao et al., 1990, Lin et al., 1994), war in unserer Arbeitsgruppe bereits vor einiger Zeit eine E1B-55k-resistente $p53$ -Variante generiert worden (Roth et al., 1998). Mit diesem $p53^{mt24-28}$ stand nun erstmals ein Werkzeug zur Verfügung, den Einfluß von $p53$ auf die Adenovirusreplikation direkt durch Überexpression der nicht-abbaubaren $p53$ -Variante, $p53^{mt24-28}$, zu analysieren (Koch et al., 2001). Die Autoren haben den Einfluß sowohl von überexprimiertem wt- $p53$ als auch der überexprimierten E1B-55k-resistenten $p53$ -Mutante auf die Replikationsfähigkeit ausschließlich von wt-Adenoviren untersucht (Koch et al., 2001). Die verwendeten Zelllinien waren wie folgt gewählt: H1299 Zellen sind genotypisch $p53^{-/-}$ und sollten daher keine weiteren Mutationen im $p53$ Regelkreis aufweisen. Frisch isolierte humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) besitzen ebenfalls einen intakten $p53$ Pathway. Es stellte sich heraus, daß ein Einfluß

auch des massiv überexprimierten p53 auf die Adenovirusreplikation nicht feststellbar war (Koch et al., 2001). Es blieb also die Frage: Warum hat Adenovirus dieses p53-antagonisierende Protein E1B-55k entwickelt und in seinem Genom über Generationen hinweg erhalten?

2.2. Aufgabenstellung:

Das E1B-55k-deletierte, tumorselektive Adenovirus, ONYX-015 ist in seiner Replikationsfähigkeit behindert (Pilder et al., 1986a, Barker et al., 1987, Steegenga et al., 1999b), weil durch das Fehlen des E1B-55k Proteins auch der Mediator des selektiven Exports der viralen späten mRNA-Transkripte nicht mehr vorhanden ist (Babiss et al., 1985, Pilder et al., 1986a, Leppard et al., 1989). Kurz vor Beginn der Arbeiten war eine Punktmutante von E1B-55k beschrieben worden, E1B-55k R239A, welche zwar nicht mehr an p53 zu binden vermag, gleichzeitig aber noch kompetent für den virus-host-shut-off, den selektiven Export der späten viralen Transkripte, ist (Shen et al., 2001). Die Autoren hatten aber weder untersucht, ob dieses punktmutierte E1B-55k Protein die transkriptionelle Aktivität von p53 noch zuläßt, noch hatten sie Untersuchungen dazu angestellt, ob Viren, die für dieses punktmutante *E1B-55k* kodieren, sich auf p53-positiven Zellen selektiv besser vermehren, also eine onkolytische Spezifität aufweisen (Shen et al., 2001). Auch von E1A ist bekannt, daß es sowohl zu der Akkumulation von p53 in den adenovirusinfizierten Zellen beiträgt (Lowe et al., 1993a), auf der anderen Seite aber behindert E1A die transkriptionelle Aktivität von p53 (Steegenga et al., 1996, Somasundaram et al., 1997, Lill et al., 1997b). Somit stellt sich die Frage: Kann die Tumorselektivität eines E1B-mutierten Adenovirus gesteigert werden, indem man zusätzlich gezielt Mutationen in das *E1A* Gen einführt?

Auch die Arbeiten von Koch et al. (Koch et al., 2001) ließen durchaus noch Fragen offen: Obwohl wir mit Hilfe der Mutante p53mt24-28 die E1B-55k-p53 Interaktion ausgeschaltet hatten (Roth et al., 1998), beobachteten wir dennoch keinen restringierenden Einfluß des überexprimierten p53mt24-28 auf die Adenovirusreplikation. Dies könnte daran liegen, daß Adenovirus neben E1B-55k und E4 orf6 noch weitere p53-inaktivierende Genprodukte kodiert. Ein guter Kandidat wäre E1B-19k. In Abwesenheit von E1B-19k zeigte sich - und zwar in Abhängigkeit von dem p53-Status der Zielzellen - eine vermehrte Lyse der infizierten Zellen (Sauthoff et al., 2000, Pilder et al., 1984). Ein Einfluß des p53-Status auf die Replikationseffizienz konnte hingegen nicht bemerkt werden (Sauthoff et al., 2000). Möglicherweise ist E1B-19k, auch ohne direkt mit p53 zu

interagieren, ein weiterer viraler p53-Antagonist. Die Folgen einer p53-Akkumulation, die in dem Auslösen der Apoptose bestehen, können durch E1B-19k verhindert werden (Bernards et al., 1986, Barker et al., 1987, Debbas et al., 1993, Han et al., 1996, Cuconati et al., 2002). Kann man also die Sensitivität der tumorspezifischen Adenoviren gegenüber p53 dadurch noch weiter steigern, daß man zusätzlich zu der inaktivierenden Mutation des E1B-55k auch den überlappenden Leserahmen E1B-19k aus dem Virusgenom entfernt ?

3. Materialien

3.1. Zelllinien

A549 Zellen (p53^{+/+}, humane kleine Lungenkarzinomzellen, ATCC CCL-185.1), H1299 Zellen (p53^{-/-}, humanes Großzellen Lungenkarzinom, Lee et al., 1992), HER 911 Zellen (Adenovirus E1 transformierte humane endotheliale Retinazellen (Fallaux et al., 1996), Hela Zellen (Papillomavirus E6 & E7 transformierte humane Zervixkarzinomzellen (Schwarz et al., 1985) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium gehalten, welches zusätzlich mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 200 µM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2µg/ml Tetracyclin und 10 µg/ml Ciprofloxacin versetzt wurde.

Zum Splitten der konfluenten Zellrasen in Zellkulturflaschen der Firma Greiner wurden diese einmal mit 20 ml PBS def. (3.4.) gewaschen und bei Raumtemperatur ca. 5 Min mit Trypsin/EDTA (Fa. Gibco) inkubiert, die Suspension wurde mit 10 ml Medium versetzt und nach Auf- und Abpipettieren wurden neun Zehntel entnommen zum Verwerfen und der Rest nach Zugabe von 35 ml Vollmedium wieder bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO₂ inkubiert.

LS174T Zellen (p53^{+/+}, humane Dickdarm-Epithelzellen, Tom et al, 1976) wurden in RPMI 1640 Medium (3.4.) gehalten. Hela PML++ Zellen (stabil transfiziert mit einem geneticinresistenten Tet-Off-System und einem hygromycinresistenten, induzierbaren *Pml* Gen, Sternsdorf et al., 1995) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Vollmedium zusätzlich versetzt mit 400 µg/ml Geneticin und 200 µg/ml Hygromycin gehalten, dem anstelle des Tetracyclin 50 µg/ml Doxycyclin zugegeben wurde.

Zum Einfrieren der Zelllinien wurden konfluente Zellrasen wie gewohnt gesplittet und die Zellsuspension bei 1000 rpm in einer Heraeus Megafuge 1.0 R für 10 Min. pelletiert. Die Zelniederschläge wurden dann in Kryomedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryotubes (Fa. Gibco) aliquotiert. Diese wurden in einem 50 ml Falcon Röhrchen langsam auf -80°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff (-195°C) verwahrt.

3.2. Antikörper

Primär-Antikörper:

Antigen	Klon	Verdünnung	Spezies	Quelle
ADV E2A	B6-8	1/20	Maus mono.	(Reich et al., 1983)
p53	1801	1/20.000	Maus mono.	Oncogen Ab-2, OP09
p53	DO-1	1/20.000	Maus mono.	Oncogen Ab-6, OP43

p53	fl 393	1/400	Kaninchen	Sta. Cruz Sc6243
p21/Cip-1		1/4.000	Maus mono.	Transduction #606-259-1550
hdm2	3G5	1/100	Maus mono.	(Bottger et al., 1997)
hdm2	2A10	1/200	Maus mono.	(Lianes et al., 1994)
Ku80		1/15.000	Maus mono.	Pharmingen #65941A
β -actin		1/10.000	Maus mono.	Abcam 6276
E1B	2A6	1/100	Maus mono.	(Sarnow et al., 1982b)
E4 orf6	m45	1/200	Maus mono.	(Obert et al., 1994)
E4 orf6	RSA3	1/200	Maus mono.	(Marton et al., 1990)
E4 orf3		1/2.000	Kaninchen	(Carvalho et al., 1995)
Pml	PGM31	1/500	Maus mono.	(Flenghi et al., 1995)
PARP	Ab-2	1/2.000	Maus mono.	(Oncogene Research)
ADV hexon		1/2.000	Ziege poly.	(Biogenesis)
E1A	Ab-2	1/10.000	Maus mono.	(Calbiochem)
p53, S-15(P)	16G8	1/2.000	Maus mono.	(Cell Signalling)
bax		1/2.000	Maus mono.	(Transduction Lab.)
p73		1/1.000	Kaninchen	(Pharmingen)

Sekundär-Antikörper:

Peroxydase-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (1/20,000) Jackson Immuno Res.
 Peroxydase-gekoppelter Kaninchen anti-Maus IgG (1/20,000) Jackson Immuno
 Peroxydase-gekoppelter Esel anti-Ziege IgG (1/20,000) Jackson Immuno Res.
 Alexa Fluor 488-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG (1/400) Molecular Probes
 Alexa Fluor 594-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen IgG (1/400) Molecular Prob.
 Alexa Fluor 594-gekoppelter Ziege ant-Maus IgG (1/400) Molecular Probes

3.3. Plasmide

pAdEasy-1	(He et al., 1998)
pAdEasy-2	(He et al., 1998)
pRcp53	(Lin et al., 1994)
pCp53	(Baker et al., 1990)
pCMV.NeoBam	(Baker et al., 1990)
pCMV.NeoBam.egfp	(Hobom et al., unveröffentlicht)
pcDNA.3.1	(Invitrogen)
pcDNA.3-E1A-13S	(Wienzek et al., unveröffentlicht)
pGI3-BP100Luc	(Freedman et al., 1997)
pCGN-E1B-55k	(Dobbelstein et al., 1997)
pCMV-E4orf6	(Dobner et al., 1996)
pCMV-E4orf3	(König et al., 1999)
pCMV- β Gal	(Hobom et al., unveröffentlicht)
pcDNA.3- β Gal	(Hobom et al., unveröffentlicht)

3.4. Puffer, Lösungen

Dulbeccos Modified Eagle Medium	#22320-022 Fa. Gibco
PBS def.	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
RPMI 1640 Medium	#42402-016 Fa. Gibco
RIPA	1% Triton X-100 (v/v), 1% Desoxycholat (w/v), 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) (w/v), 20 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA, 5% Trasytol, 100.000 KIE (v/v), 10 mM Iodo-acetamid, +1 mM PMSF (aus 50 mM in iPrOH).
6x Lämmli	0,35 M Tris/HCl pH 6.8, 30% Glycerol (v/v), 10% SDS (w/v), 9,3% Dithiotheitol (w/v), 0,012% Bromphenolblau (BPB).
SDS-Laufpuffer	0,1% SDS, 25 mM Tris, 192 mM Glycin.
10x Western Salts	60,55 g Tris, 288,1 g Glycin, ad 2000 ml, pH ad 8,3, + 2 ml 20% SDS.
PBST	PBS++ + 0.1% Tween-20
PBS++	PBS def. + 1,1 mM MgCl ₂ + 1,2 mM CaCl ₂
Blocking Solution	10 % FCS in PBS++
Fluoprep	# 5521 Fa. BioMérieux
6 x DNA Probenpuffer	40% Sucrose, 10% Glycerol, 0,25% BPB.
LB-Medium	10 g Bactopepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O, ggf. +1,5% Bacto-Agar (w/v).
50x TAE-Puffer	2 M Tris, 1M Essigsäure, 0,1 M EDTA.

10 x TBE Puffer	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA.
Formamid-Puffer	80% Formamid, 25 mM EDTA pH 8,0, 50 mg/ml Dextranblau in Wasser

3.5. Oligonukleotide

Alle Primer von MWG Biotech wurden in dd H₂O zu einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

Primer für ΔE1B-19k:

337like-hin	5'-CTT GCT GGA ACA GAG CTC AAG CTT ATC TGG GTC ACC AGG CGC-3'
337like-rück	5'-GCG CCT GGT GAC CCA GAT AAG CTT GAG CTC TGT TCC AGC AAG-3'
337.Seq	5'-GTG GGC TAA TCT TGG TTA CAT CTG-3'

Primer für E1B-55k R239A:

Onyx-051for	5'-GGT TAT TAT GAA TGT AGC GTT TAC GGG CCC CAA TTT TA-3'
Onyx-051rev	5'-GCT AAA ATT GGG GCC CGT AAA CGC TAC ATT CAT AAT AA-3'
E1B-270Hin	5'-TGC TAC ATT TCT GGG AAC GG-3'

Primer für E1A.R2G Mutation:

E1A-R2G-hi	5'-CCG GGA CTG AAA ATG GGT CAT ATC ATA TGC CAC GGA GGT GTT-3'
E1A-R2G-rü	5'-AAC ACC TCC GTG GCA TAT GAT ATG ACC CAT TTT CAG TCC CGG-5'
E1A-Seq-pri	5'-GTG AGT AAG TCA ATC CCT TCC TGC-3'

Primer für E1A Δ2-36 Mutation:

E1A.2-36BstBlfor	5'-GGA CTG AAA ATG CAT TTC GAA CCA CCT ACC CTT CAC G-3'
E1A.2-36BstBlrev	5'-CGT GAA GGG TAG GTG GTT CGA AAT GCA TTT TCA GTC C-3'
Ad5 334-NotIhin	5'-CGA ATT CGC GGC CGC GTA ATA TTT GTC TAG GGC-3'

Primer für E1A Δ25-36 Mutation:

Delta.25-36FOR 5'-GGA CCA GCT GAT CCA TTT CGA ACC ACC TAC
CCT TCA CG-3'
Delta.25-36Rück 5'-CGT GAA GGG TAG GTG GTT CGA AAT GGA TCA
GCT GGT CC-3'

Primer für E1A Δ15-25 Mutation:

E1A del15-25hin 5'-GTT ATT ACC GAA GAA GAG GTA CTG GCT GAT-3'
E1A del15-25rück 5'-ATC AGC CAG TAC CTC TTC TTC GGT AAT AAC-3'

Primer für E1A L19S.L20N.L23S.I24A:

E1A.LLLIhin 5'-GAA ATG GCC GCC AGT TCT AAT GAC CAG AGC
GCT GAA GAG GTA CTG GCT-3'
E1A.LLLIrück 5'-AGC CAG TAC CTC TTC AGC GCT CTG GTC ATT
AGA ACT GGC GGC CAT TTC-3'
Seq.rev.aa130 5'-CAC AAA CTC CTC ACC CTC TTC-3'

Primer für Mdm-2-RT-PCR:

Mdm2-RT 5'-AAC ATC TGT TGC AAT GTG ATG G-3'
Mdm2-for 5'-TCA GGA TTC AGT TTC AGA TCA G-3'
Mdm2-rev 5'-CAT TTC CAA TAG TCA GCT AAG G-3'

Primer für p21-RT-PCR:

p21-RT 5'-GGA AAA GGA GAA CAC GGG ATG AGG AGG-3'
p21-hin 5'-CCT GGC ACC TCA CCT GCT CTG CTG-3'
p21-rück 5'-GCA GAA GAT GTA GAG CGG GCC TTT-3'

Primer für Ad II-Orf3:

Orf3-fo 5'-TTT AAG CTT TTA TTC AAA AGA TTA TCC AAA AC-3'
Orf3-rev 5'-AAA CCA TGG TAC TAA GCG ACG AAC TCC-3'

3.6. Viren

Ad 300 wt	(Ensinger et al., 1972)
Ad dI309	(Jones et al., 1979)
Ad E4inorf3	(Huang et al., 1989)
Ad dI337	(Pilder et al., 1984)
Ad dI338	(Pilder et al., 1986a)
Ad p53mt24-28	(Koch et al., 2001)
Ad βGal	(Koch et al., 2001)
Ad E1B R239A	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad ΔE1B-19k	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad 2x mut	(Hobom et al., unveröffentlicht)

Ad E1B R239A.E1A R2G	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad E1B R239A.E1A Δ 25-36	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad 2x mut E1A Δ 25-36	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad II-Orf3	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad II- β Gal	(Hobom et al., unveröffentlicht)
Ad p73 Δ N α	(Kartasheva et al., unveröffentlicht)
Ad p73 Δ N β	(Kartasheva et al., unveröffentlicht)

4. Methoden

4.1. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

SDS Polyacrylamid-Gele bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Für ein 10%iges Trenngel verwendet man ein Gemisch aus 15,8 ml dd H₂O, 13,3 ml einer 30%igen Acrylamid-Lösung (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1), 10,0 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 200 µl 20% SDS. Zur Initiation der Polymerisation versetzt man mit 400 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat und 16 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) und überschichtet mit Isopropanol.

Zur Herstellung des 5%igen Sammelgels verwendet man 13,6 ml dd H₂O, 3,4 ml einer 30%igen Acrylamid-Lösung, 2,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8, 100 µl 20% SDS, 200 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat und 20 µl TEMED.

Die infizierten (transfizierten) Zellen werden in 6 well Platten mit einem Gummi-schaber abgekratzt, die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4000 rpm (1780 x g) in einer Hettich-Tischzentrifuge pelletiert. Der Niederschlag wird in 200 µl RIPA (3.4.) aufgenommen und mit 50 µl 6xLämmli versetzt. Durch auf- und abpipettieren und vortexen wird die zelluläre DNA fragmentiert und die noch viskose Lösung für 5 Min. bei 95°C hitzeinaktiviert.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer (3.4.) bei 90 V und unlimitierter Stromstärke. Als Größenstandard wurde der prestained Marker von Gibco verwendet.

4.2. Western-Blotting-Verfahren

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran B83, 0,2 µm Porengröße, Fa. Schleicher & Schüll) erfolgte im Naßblotverfahren. Ein oder mehrere Lagen Whatmanpapier wurden in Western Salts / 15% Methanol eingeweicht und mit der wassergetränkten Nitrocellulosemembran überschichtet. Darauf folgt luftblasenfrei das Trenngel, erneut überschichtet mit eingeweichtem Whatmanpapier, gefolgt von einem das Stromfeld verwirbelnden Schwamm. Der Transferblot erfolgt nun, die Nitrocellulose-Membran zur Anodenseite, in Western Salts / 15% Methanol bei 37 V und 500 A über Nacht.

4.3. Immunodetektion von Proteinen

Die Nitrocellulosemembran (4.2.) wird mit 5% Milchpulver in PBST (3.4.) geblockt. Anschließend werden die Primär-Antikörper aus 3.2. zugegeben und 2 h unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach vielfachem Waschen in PBST

werden die Sekundär-Antikörper aus 3.2. zugegeben und 1 h inkubiert. Nach gründlichem Waschen in PBST werden die Luminol- und H_2O_2 -Komponenten des Super Signal West Dura Kits (Fa. Pierce) 1:1 gemischt. Man träufelt 1 ml des Gemisches auf den Blot, streicht die überschüssige Lösung heraus und schweißt die Nitrocellulosemembran in Krups Haushaltsfolie ein. Zur Detektion der Proteinbanden werden Kodak Biomaxx Filme verwendet.

4.4. Immunfluoreszenz

In einem heparinbeschichteten 4 well Objektträger (Fa. Labtek) werden am Vortag 80,000 Zellen ausgesäht. Die infizierten (transfizierten) Zellen werden nach einem Waschen mit PBS++ mit 4% Paraformaldehyd für 15-20 Min. fixiert. Nach zweimaligem Waschen wird für 20-30 Min. mit 0,2% Triton X-100 in PBS++ lysiert. Nach gründlichem viermaligen Waschen wird für 10 Min. in Blocking Solution geblockt. Danach wird mit dem Erstantikörper (3.2.) in Blocking Solution dekoriert, mit PBS++ gewaschen und mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS++ werden die Zellkerne mit 0,1 ng/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indol, dilactat) gefärbt (3 Min.) und die überstehende Lösung verworfen. Nun werden die Objektträger von den Vertiefungen (wells) abgetrennt, mit reichlich 2,5% DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]octan) in Fluoprep (Fa. Bio Merieux) überschichtet und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Zur Detektion wird ein Zeiss Axiophot Mikroskop verwendet.

4.5. Klonierung von Plasmiden

Für einen präparativen Verdau werden 2 µg DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut (Temperatur- und Salzbedingungen nach Herstellerangaben, Fa. New England Biolabs). Der aufnehmende Vektor wurde mit alkalischer Phosphatase (Fa. Roche) behandelt. Die DNA-Fragmente wurden auf einem TAE-Agarosegel getrennt und unter mildem UV-Licht (326 nm) ausgeschnitten. Die Bande (200 µg) wurde in 600 µl Puffer QC (Fa. Qiagen) bei 70°C resuspendiert. Erforderlichenfalls wurde mit 200 µl Isopropanol versetzt. Binden, Waschen und Elution von den Reinigungs-Säulchen gemäß Herstellerangaben (QIAquick gel extraction Kit, Fa. Qiagen). Vektor- und Insertmengen wurden auf einem Ethidiumbromid gefärbten TAE-Agarosegel bestimmt und im Verhältnis 1:5 für die Ligation eingesetzt. Hierzu wurde mit 5 x Ligationspuffer (Fa. Gibco) komplementiert mit 1 µl 100 µM ATP (Fa. Boehringer Mannheim) und 1,5 µl T4 DNA-Ligase (Fa. Gibco) versetzt.

Nach 2 h Ligation bei RT erfolgte die Transformation in chemisch kompetente Bakterien (DH10B Bakterien wurden bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 (590 nm) auf Eis abgekühlt. Ernten durch Zentrifugation bei 2.600 x g. Das Pellet wird in 0,1 M $MgCl_2$ resuspendiert. Nach 20 Min. Inkubation auf Eis er-

neute Zentrifugation für 10 Min. bei 1500 x g. Das Pellet wird in 0,1 M CaCl_2 aufgenommen und nach 1 h auf Eis ad 80% mit Glycerol versetzt, schließlich aliquotiert und in N_2 (l) schockgefroren). Inkubation von 10 μl Bakterien mit 1/5 des Ligationsansatzes für 15 Min. auf Eis, 45 Sek. bei 42°C, 3 Min. auf Eis, Zugabe von 200 μl LB-Medium, erforderlichenfalls Inkubation 20 Min. 37 °C, dann ausplattieren auf LB-Agarplatten. Präparative DNA (Kapitel 4.6.) aus Übernachtskulturen ausgewählter Einzelkolonien wird mit geeigneten Restriktionsenzymen kontrollverdaut.

E1B-55k ist ein für Bakterien toxisches Produkt. Es wurden *Epicurian coli* SURE Bakterien (Fa. Stratagene) verwendet. Einmal in Bakterien transformiert mußte ohne Unterbrechung bis zur DNA Gewinnung nach Kapitel 4.6. durchgeführt werden.

4.6. DNA-Präparation aus E. coli

15 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium (3.4.) wurden in einer Heraeus Megafuge 1.0 R pelletiert und der Überstand sukzessive mit 500 μl einer Resuspensionslösung (L1), 500 μl einer alkalischen seifenhaltigen Aufschlußlösung (L2) und 700 μl einer essigsäuregepufferten Neutralisationslösung (L3, alle Peqlab) versetzt. Nach Zentrifugation des Niederschlags wurde der Überstand affinitätschromatographisch gereinigt (rosafarbene E.Z.N.A.-Röhrchen Fa. Peqlab), gewaschen (Puffer HB & WB aus Kit) und nach Entfernen letzter Ethanolreste in 50 μl 10 mM Tris/HCL pH 7.4, 1 mM EDTA (EB-Puffer) eluiert und der DNA-Gehalt UV-photometrisch bestimmt.

4.7. DNA-Präparation aus menschlichen Zellen

Die Präparation viraler DNA aus infizierten Zellen erfolgte unter Verwendung des DNA Tissue Kits der Fa. Qiagen. Die abgeschabten Zellen wurden vorsichtig bei 300 x g pelletiert und in 200 μl PBS def. resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μl des SDS-haltigen Lysepuffers AL wurden die Proteine mit 400 μg Proteinase K für 15-30 Min. bei 70°C verdaut. Es wurde mit 200 μl Ethanol gefällt, die DNA affinitätschromatographisch gereinigt, mit 75% Ethanol gewaschen und mit 400 μl AE-Puffer eluiert. Der DNA-Gehalt wurde UV-spektrometrisch bestimmt.

4.8. Semi-quantitative RT-PCR zur RNA-Quantifizierung

Infizierte (transfizierte) Zellen wurden 1 x vorsichtig in PBS gewaschen und 5 Min. in 1 ml Trizol (Fa. Gibco) lysiert. Nach heftigem Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension mit 200 µl Chloroform überschichtet und 30 sec. intensiv über Kopf geschüttelt. Zur Phasentrennung wird 15 Min. bei 12,000 x g zentrifugiert. Nach Versetzen des Überstandes mit 500 µl Isopropanol wird 15 sec. kräftig von Hand geschüttelt. Nach kurzer (5 Min.) Inkubation bei RT wird 10 Min. bei 12,000 x g und 4°C pelletiert. Der Niederschlag wird einmal mit 75% Ethanol gewaschen, der Überstand quantitativ entfernt und für 10 Min. an der Luft getrocknet. Nach Aufnahme in 20 µl Wasser wird der RNA-Gehalt UV-photometrisch bestimmt und 2 µg für die reverse Transkription eingesetzt. Hierzu gibt man 2 pmol Primer und füllt mit Wasser auf 12 µl auf. Nach 10 minütigem Denaturieren bei 70°C kühlt man auf 42°C und versetzt währenddessen mit 4 µl First strand Buffer (Fa. Gibco), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP und mischt. Nachdem die Synthesetemperatur von 42°C erreicht ist, gibt man 1 µl Superscript II (Fa. Gibco) zu und inkubiert für 50 Min. bei 42°C. Der Reaktionsansatz wird für 15 Min. bei 70°C hitzeinaktiviert.

Das so erhaltene DNA-Templat kann entweder bei -20°C gelagert werden oder es wird sofort für die semi-quantitative PCR eingesetzt: Pro Probe wählt man einen Ansatz von vier bis fünf Hütchen für die verschiedenen Zeitpunkte. In ein Cup kommen jeweils: 2 µl 10x HiFi Buffer (Fa. Roche), 0,1 µl 20 mM dNTP, 140 ng Hin-Primer, 140 ng des eingenisteten Rück-Primers, 0,15 µl der HiFi-Polymerase (Fa. Roche) sowie je 0,4 µl des Reaktionsansatzes aus der reversen Transkription. Das Volumen in den Eppendorf-Gefäßen wird auf 20 µl eingestellt. Nach einer dreiminütigen Denaturierungsphase bei 95°C wurde ein Temperaturkreislauf bestehend aus 95°C - 25 Sek., 55°C - 25 Sek., 70°C - 2 Min. gefahren. Nach einer gewissen Anzahl Zyklen (z. B. 15, 20, 25 usf.) wurde jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß aus dem PCR-Block entnommen, auf Eis gekühlt, mit 4 µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 2%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Durch Färben mit Ethidiumbromid konnte das Amplifikat im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

4.9. Quick-Change Mutagenese von Plasmiden

50 ng eines geeigneten DNA-Templats wurden mit 5 µl 10x PCR-Puffer, 125 ng Primer #1, 125 ng Primer #2 und 1 µl 10 mM dNTP gemischt und mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl Pfu-Polymerase (Fa. Gibco) wurde bei 95°C für 30 Sek. denaturiert. Anschließend wurde bei 95°C - 30 Sek., 50°C - 1 Min., 68°C - 2 Min./kb gecycled. Je nach Aufgabenstellung wurde der Reaktionskreislauf nach 12 (Punktmutation), 16 (einzelne Aminosäureaustausche), 18 (Deletionen) oder auch 20 (Insertionen) Zyklen abgebrochen. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C mit 2 µl *DpnI* (Fa. New England Biolabs) verdaut und durch Zugabe von 1 µl Glykogen (Fa. Roche), 0,1 Vol 3 M NaOAc pH 5,5 (Fa. Riedel de Haen) und 2,5 Vol EtOH (Fa. Fluka) gefällt. Nach

einmaligem Waschen mit 75% EtOH wurde 30 Min. bei RT getrocknet und in 5 µl Wasser aufgenommen. Hiervon wurden 0,5 µl mit 8 µl elektrokompetenten DH10B Bakterien (Fa. Gibco) gemischt und bei 1,7 kV, 25 µF in einer 0,1 cm Küvette elektroporiert (Fa. Biorad). Das Reaktionsgemisch wurde mit 300 µl LB-Medium versetzt und sofort auf einer LB-Agar Platte (1,5%, Fa. Roth) ausplattiert (Amplizillinresistenz), oder nach einer 30-minütigen Inkubation im Überkopf-Schüttler bei 37°C (Kanamycinresistenz) ausplattiert.

4.10. Herstellung rekombinanter Viren

Alle Quick-Change Mutagenesen wurden ausgehend von einem Plasmid pShuttle340 (G. Horn, unveröffentlicht) durchgeführt. pShuttle340 ist ein Derivat des ursprünglichen pShuttle (He et al., 1998), bei dem in einer vielstufigen Synthese (A. Waltermann und G. Horn, unveröffentlicht) mehrere, teilweise fehlerhafte (c380t, g763c, g800a, t907c, a1922c, a2023g) Bruchstücke des Adenovirusgenoms so aneinandergesetzt wurden, daß zwischen den Homologien 'linker Arm' und 'rechter Arm' des ursprünglichen pShuttle (He et al., 1998) eine DNA-Sequenz eingefügt wurde, die im wesentlichen der E1-Region des Adenovirus entspricht. Unter Verwendung der Primer aus 3.6. wurde nun nach 4.9. mutagenisiert.

Nach 4.6 hergestellte DNA wurde über Nacht mit *PmeI* oder *EcoR I* (Fa. New England Biolabs) linearisiert. Nach Ethanol-fällung wurde der Ansatz in 5 µl Wasser aufgenommen. Hiervon wurden 1 µl zu 20 µl elektrokompetenten BJ5183 Bakterien (He et al., 1998), die bereits das pAdEasy-1 oder pAdEasy-2 Plasmid (He et al., 1998) enthielten, gegeben (Herstellung elektrokompetenter BJ5183 - siehe Kapitel 4.11.). In einer 0,2 cm Küvette wurde bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF in einem Biorad Genepulser elektroporiert. Nach 30-minütiger Inkubation nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde auf LB-Agar-Platten ausplattiert und mittels 25 mg/l Kanamycin auf positive Rekombinanten selektiert. Nach 40 h (!) Inkubation bei 37°C wurden die kleinsten Klone gepickt (große Klone: Ausgangsplasmid (ca. 11 kb), kleine Klone rekombiniertes Plasmid (ca. 38 kb). Die nach 4.6. gewonnene DNA wurde unverdaut auf ein 0,5% TAE-Agarosegel aufgetragen.

Bei der gewünschten Größe (38 kb) wurden 20 µg DNA mit *PacI* verdaut (über Nacht, Herausschneiden einer 3.0 kb oder 4.5 kb großen Kassette), ethanol-gefällt und mit Lipofectamin PLUS (siehe Kapitel 4.12.) in 911 bzw. 911-E4 Zellen transfiziert. Unter gelegentlichem Mediumwechsel wurde ein überdichter Zellrasen 7 Tage in 6-Loch Platten gehalten, danach erforderlichenfalls in 25 cm² Flaschen überführt (Fa. Greiner). Meist traten erste Plaques nach 5-6 Tagen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ auf. Bei einem überwiegend infizierten Zellrasen (z.B. nach 8 d) wurden die infizierten Zellen mit einem Zellschaber geerntet, bei 3000 rpm pelletiert und durch 3 maliges Einfrieren/Auftauen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Zum Anlegen eines Virusstocks wurden mehrere 175 cm² Flaschen einer permissiven Zelllinie mit diesen Überständen infiziert (siehe Kapitel 4.13), nach 60 h wie oben beschrieben

geerntet und die Lysate bei -80°C in PBS gelagert. Der Virusstock wurde nach Kapitel 4.4. titriert, die Virus-DNA nach 4.7. präpariert und nach 4.15. sequenziert.

4.11. Herstellung elektrokompetenter BJ5183 Bakterien

BJ5183, ein recQ-positiver Bakterienstamm, erlaubt homologe Rekombination von Plasmiden mit linearisierten Fragmenten bei einem Überlappungsbereich idealerweise >500 bp. Diese werden mit 50 ng pAdEasy-Plasmid transformiert und auf Agarplatten mit Ampizillin (100 mg/l) und Streptomycin (30 mg/l) ausplattiert. Mehrere (8) Kolonien werden in 2 ml LB/Amp/Strep-Medium über Nacht hochgezogen. Anhand der nach 4.6. präparierten DNA überzeugt man sich mittels geeigneter Methoden von der Richtigkeit der Klone (z. B. *Hind* III-Verdau). Ein bestätigter Klon wird in LB/Amp/Strep-Medium angezüchtet. 1 ml der Übernachtskultur wird in 1000 ml LB/Amp/Strep-Medium verdünnt und für ca. 4 h kräftig geschüttelt. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 wird der Reaktionsansatz mit Hilfe von ausreichend Eis auf 4°C gekühlt. Die Bakteriensuspension wird bei 2.600 x g, verteilt auf mehrere 50 ml Falcons zentrifugiert. Die Niederschläge werden vereinigt und mehrmals (3x) in auf 4°C vorgekühltem Waschpuffer (10% Glycerol in Wasser) resuspendiert und bei 2.600 x g erneut pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wird der Bakterienniederschlag in wenig (3ml) Waschpuffer aufgenommen und aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.12. Transiente Transfektion von Zellen

Jegliche der hier verwendeten adhärennten Fibroblastenzellen eignen sich hervorragend für die Lipofektion. Am Vortag wurden 400.000 Zellen pro 6 well Loch ausgesäht, um einen ca. 90% konfluenten Zellrasen zu erhalten. Für Lipofectamin 2000 (Lipofectamin PLUS; beide Fa. Gibco) wurden 2,4 µg (5 µg) DNA mit 100 µl DMEM ohne alles (zuzüglich 6 µl PLUS-Reagenz) gemischt. In einem separaten Ansatz wurden 8 µl (4 µl) Lipofectamin 2000 (Lipofectamin +) zu ebenfalls 100 µl DMEM ohne alles gegeben und sanft gevortext. Als nächstes wurden die zu transfizierenden Zellen 2 x mit PBS def. gewaschen, dann 20 Min. in PBS def. gelassen (Hungern). Der das Transfektionsreagenz enthaltende 100 µl Ansatz wurde nun zu der in DMEM ohne alles gelösten DNA (zzgl. PLUS-Komponente) hinzugegeben, das Gemisch erneut gevortext und 15 Min. bei RT inkubiert. Für die Lipofectamin 2000-Transfektion versorgt man die zu transfizierenden Zellen so rechtzeitig mit 1,5 ml Vollmedium, daß man unmittelbar darauf den Transfektionsansatz dazuträufeln kann. Die 6-Loch Platte wird noch kurz in entweder x- oder y-Richtung hin- und hergeschoben und kann nach 24h Inkubation im Brutschrank geerntet werden (siehe Kapitel 4.1., 4.14., 4.7., 4.8.).

Zur Lipofection mit Lipofectamin PLUS versorgt man die in PBS def. gehaltenen Zellen mit 800 µl DMEM ohne alles und gibt hierzu nach 15 minütigem Warten den Transfektionsansatz. Die 6-Loch Platte wird 3 h auf dem Schüttler bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO₂ hin- und hergeschwenkt. Danach Zugabe von 3 ml Vollmedium.

4.13. Infektion von Zellen

Am Vortag werden jeweils 300.000 Zellen oder weniger in die Vertiefung einer 6-Loch Platte gegeben. Vor dem Auftauen der in PBS def. bei -80°C gelagerten Viren werden die zu infizierenden Zellen 2 x mit PBS def. gewaschen und dann 15 Min. in eiskaltem PBS def. inkubiert (911 Zellen: 5 Min.). Man ersetzt das PBS def. durch 1 ml DMEM ohne alles und inkubiert mit der Virussuspension 3 h auf dem Schüttler. Danach Waschen mit PBS def. und Zugabe von ausreichend Vollmedium. Die für eine flächendeckende Infektion zu verwendende Menge an Viren (m.o.i.) muß für jede Zelllinie getrennt ermittelt werden.

4.14. Luziferase-Assay

150.000 Zellen werden pro Vertiefung einer 12 well Platte ausgesäht. Transfektion mit Lipofectamin 2000 wie in Kapitel 4.12., alles halbe Mengen. Zur Ernte wird der 5 x Promega Reporter Lysis Puffer 1:5 mit Wasser verdünnt. 24 h nach Transfektion werden die Zellen 1 x mit PBS def. gewaschen und dann mit 75 µl Reporter Lysis Puffer versetzt. Über 15 Min. wird gelegentlich geschwenkt. Dann Abschaben der Zellen mit Zellschaber und Überführen der Suspension in Eppendorfgefäß. Nach 1 Min. Zentrifugation bei 20.000 x g werden 20 µl des Überstandes - oder eine auf 20 µl aufgefüllte Verdünnung - in eine 96 Loch Platte gegeben. Dort versetzt das Luminometer Lumicontrol 32 (Fa. Beckton Dickenson) die Proben nach und nach mit je 100 µl des Luziferase Reagenz (Fa. Promega) und bestimmt die Lumineszenz.

4.15. DNA-Sequenzierung

2 µg DNA oder 11 µl Minipräpeluat, 8 µl Big-Dye Termination Mix (Fa. Perkin Elmer) und 3.2 pmol Primer werden mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Es werden 25 Reaktionszyklen bei 96°C - 10 Sek., 50°C - 5 Sek., 60°C - 4 Min. gefahren und der Ansatz ethanolgefällt. Das getrocknete Pellet wird in 4 µl Formamid-Puffer aufgenommen und kurz vor dem Auftragen für 3 Min. bei 95°C aufgekocht, dann auf Eis abgeschreckt. Die Glasplatten für das Sequenziergel werden mit Alconox/Wasser vorbehandelt und anschließend mit Isopropanol gereingt. 21 g Harnstoff werden zusammen mit 8,4 ml 30% Acrylamidlösung

und 20 ml Wasser gelöst. Nach Zusatz von 6 ml 10 x TBE wird über einen 0,2 µm Porenfilter blasenfrei genutscht. Zur Initiation der Polymerisation versetzt man mit 15 µl TEMED (Tetraethylmethyldiamin) und 350 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat). Der Laufpuffer ist 1 x TBE, 2500 V, 48 W, 8 h in Abi Prism 377 (Fa. Amersham).

4.16. Transkriptom-Analyse mit DNA-Micro-Array

10.000.000 Hep-2 Zellen werden 10h nach Infektion (24h nach Transfektion) in Trizol geerntet und die RNA isoliert. 10 µg RNA werden mit 2 µl CDS-Primern (Clontech Cancer Array) und 14 µl Labelling-Mix gemischt (Labelling-Mix: 14 µl 5x Rxn-Buffer, 7 µl 10x dNTP-Mix, 12 µl α^{32} PdATP 3.000 Ci/mmol (10 µCi/ml), 3,5 µl DTT). RNA und Primer werden 2 Min. bei 70°C denaturiert, dann 2 Min. bei 50°C inkubiert. Währenddessen Zugabe von 7 µl MMLV-RT (Clontech Kit) zu dem dem Labelling-Mix. Dann 14 µl Labelling-Mix zu den Reaktionen geben und 25 Min. bei 50°C inkubieren. Nach 25 Min. 1 µl Superscript II (Fa. Gibco) zugeben, erneut 25 Min. bei 50°C inkubieren. Nach Zugabe von 2 µl 10x Termination-Mix (Fa. Clontech) wird die Reaktion bei 4°C gestoppt.

Die nicht eingebaute Radioaktivität wird säulenchromatographisch entfernt. Der Reaktionsansatz wird mit 180 µl Puffer NT2 verdünnt und bei 14.000 rpm auf die Säulchen (Fa. Amersham) aufgebracht. Die Säulchen werden insgesamt 3x mit je 400 µl Puffer NT3 (Fa. Amersham) gewaschen. Zur Elution wird 2 Min. mit Puffer NE inkubiert, dann 1 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Zur Prähybridisierung der Nylonmembran wird Express Hyb (Fa. Ambion) in der Mikrowelle zur Homogenität erwärmt. 0.5 mg Lachssperm-DNA werden für 5 Min. bei 95°C denaturiert, dann eiskühlt und zu 9 ml 68°C warmer Express Hyb-Lösung gegeben. Die Nylonarrays werden kurz in kochender 0,5% SDS geschwenkt und für 30 Min. in Express Hyb (68°C) prähybridisiert. Zu 200 µl radioaktivem Probeneluat werden 22 µl 10x Denaturierungslösung gegeben (1 M NaOH, 10 mM EDTA) und für 20 Min. auf 68°C erhitzt. Dann Zugabe von 5 µl Cot-1 DNA und 225 µl Neutralisationslösung (1 M NaH₂PO₄). Der Ansatz wird direkt zu der Prähybridisierungslösung gegeben und über nacht bei 68°C inkubiert. Waschen I mit 2x SSC, 1% SDS (4x je 25 ml), Waschen II mit 0,1x SSC, 0,5% SDS (1x bei 68°C), dann 1x Waschen I bei RT. Einschweißen und Exposition auf Bioimagerplatte (Fa. Agilent Technologies).

5. Ergebnisse

5.1. Adenovirusinfektion führt zu einer Inhibierung, der Relokalisation und dem Abbau des zellulären Transkriptionsfaktors p53.

Für das frühe adenovirale Protein E1B-55k ist gezeigt worden, daß es mit p53 interagiert (Sarnow et al., 1982a). In dem Komplex von E1B-55k mit p53 ist ein weiteres adenovirales Protein gefunden worden. Es wird von dem offenen Leserahmen 6 der frühen Transkriptionseinheit 4 des Adenovirus kodiert (Sarnow et al., 1984). Für Viren, bei denen dieses E4 orf6 Protein deletiert worden ist, ist eine irreguläre Akkumulation des zellulären p53 in den virusinfizierten Zellen beobachtet worden (Grand et al., 1994). In Zellen, die mit einem solchen Ad Δ E4orf6 infiziert wurden, liegt p53 in zytoplasmatischen Clustern an E1B-55k gebunden vor (Zantema et al., 1985a, Blair et al., 1988). Andere Gruppen hatten gezeigt, daß E1B-55k und E4 orf6 zusammen zu einem spezifischen Abbau des zellulären p53 führen (Querido et al., 1997, Steegenga et al., 1998). Fehlt eines dieser beiden Proteine, so kann in Zellen, die mit einem solchen mutanten Adenovirus infiziert worden sind, p53 nicht mehr abgebaut werden (Grand et al., 1994).

Wir haben nun gefragt, ob diese beiden adenoviralen Proteine, E1B-55k und E4 orf 6, nicht nur notwendig, sondern auch die einzigen viralen Proteine sind, die für das Einleiten des gezielten p53-Abbaus durch das Virus erforderlich sind. Hierzu wurden Hep-2 Zellen entweder alleine mit einem Expressionsplasmid für E1B-55k transfiziert oder es wurde dieses E1B-55k exprimierende Plasmid zusammen mit einem weiteren Vektor transfiziert, der für das adenovirale E4 orf6 Protein kodiert (Abb. 1A). Diese beiden Transfektionsansätze sollen die frühe Phase und die mittlere Phase einer Adenovirusinfektion nachstellen. Während E1B-55k von Beginn der Adenovirusinfektion an produziert wird (also etwa 5h nach Infektion) (Bos et al., 1981), wird das E4 orf6 Produkt, zu dessen Expression ein alternatives Spleißen des E4 Transkriptes erforderlich ist (Tigges et al., 1984), erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt synthetisiert; beginnend 16h nach Infektion (König et al., 1999).

In uninfizierten Zellen ist p53 weit überwiegend im Zellkern zu finden, wo es diffus verteilt ist (Abb. 1A, Spur 1). Wie erwartet, führt die Expression von E1B-55k alleine zu einer Relokalisation des p53 in das Zytoplasma. Dort wird es von E1B-55k in Ablagerungen gehalten, in denen auch E1B-55k zu finden ist (Abb. 1A Spur 2). Wird nun zusätzlich zu E1B-55k auch E4 orf6 in die Zellen gebracht, so beobachtet man eine dramatische Relokalisation des E1B-55k. Bei einem Überschuß von E4 orf6 lösen sich die zytoplasmatischen Cluster bestehend aus E1B-55k und p53 wieder auf. Jetzt, in Gegenwart von E4 orf6, ist E1B-55k vollständig im Kern zu finden, wo es diffus verteilt ist (Abb. 1A, Spur 3). Gleichzeitig ist p53 in den Zellen, die zusätzlich mit E4 orf6 transfiziert wurden, nicht mehr nachzuweisen. Dies entspricht genau der Situation, wie man sie auch für virusinfizierte Zellen findet. Es ist uns also gelungen, zu zeigen, daß die beiden Proteine E1B-55k und E4 orf6 nicht nur notwendig sind, um die Zelle so umzuprogrammieren, daß p53 gezielt abgebaut wird, sie sind auch bereits ausreichend.

Da wir also beide Phasen des Antagonismus des Adenovirus gegenüber dem p53 *in vitro* nachstellen konnten, schlagen wir für virusinfizierte Zellen folgendes Modell vor (Abb. 1B): E1B-55k alleine bindet und inaktiviert zelluläres p53, indem es p53 davon abhält, im Zellkern als Transkriptionsfaktor zu wirken. Zu einem späteren Zeitpunkt im Infektionsverlauf steht auch E4 orf6 zur Verfügung. E4 orf6 ist ein cullin-artiges Molekül, welches in der Lage ist, aktivierte Ubiquitinreste zu erwerben und diese an E1B-55k weiterzureichen (Querido et al., 2001). Mit Hilfe von E4 orf6 kann E1B-55k, welches nach wie vor spezifisch an p53 bindet, als E3-Ubiquitinligase für p53 wirken (Querido et al., 1997, Querido et al., 2001, Harada et al., 2002). p53 wird dadurch für den proteasomalen Abbau markiert, was letztlich zu einem Verschwinden des p53 aus den infizierten Zellen führt.

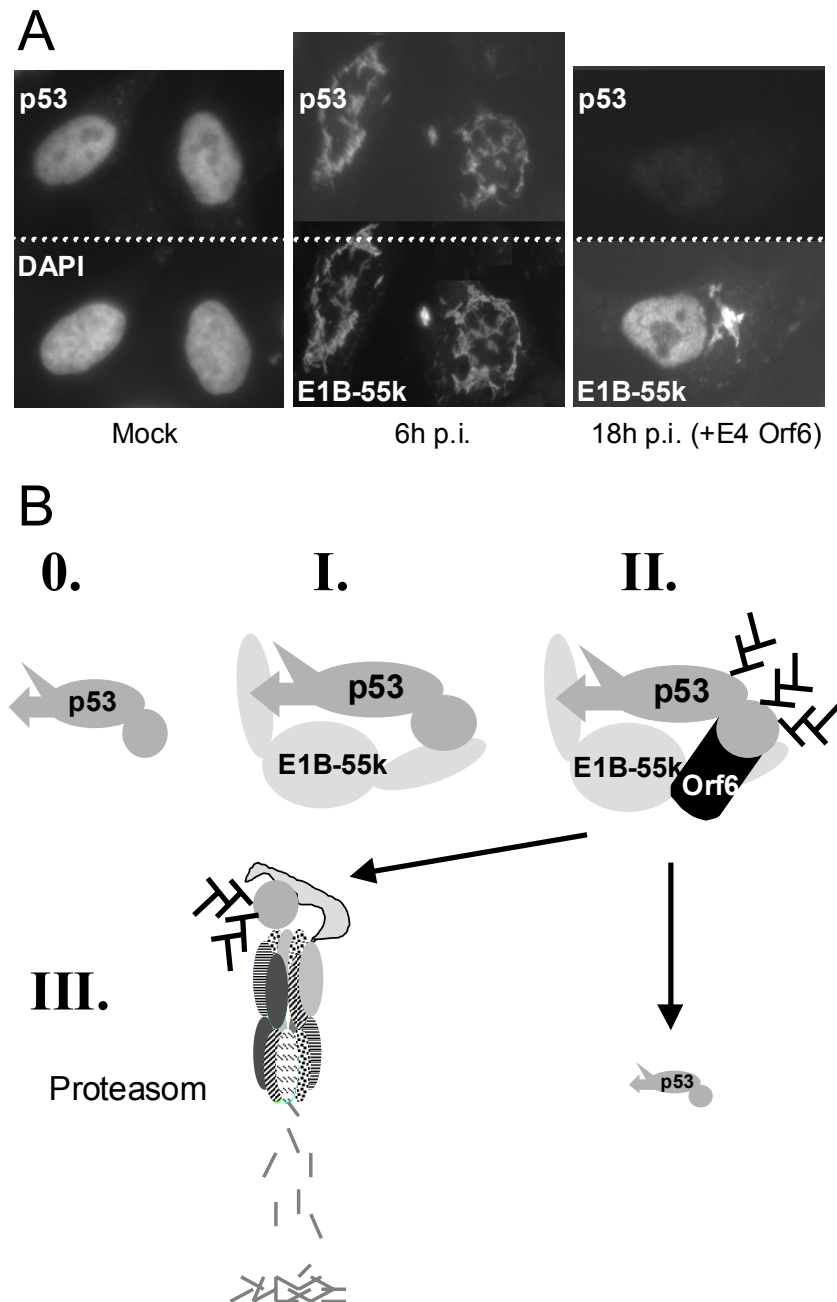


Abb. 1. E1B-55k bindet und inaktiviert p53. **(A)** Hep-2 Zellen wurden zur Simulation der frühen bzw. späten viralen Genexpression in Gegenwart von 30 ng pRcp53 (linke Spalte) mit 50 ng pCGN-E1B-55k und 190 ng pCMV-βGal (mittlere Spalte) bzw. 50 ng pCGN-E1B-55k und 190 ng pCMV-E4orf6 (rechte Spalte) transfiziert. Die fixierten Zellen wurden immungefärbt gegen p53 (fl 393, obere Zeile) bzw. gegen DAPI (linke untere Zeile) oder E1B-55k (2A6, mittlere und rechte untere Spalte). **(B)** Die immunohistochemischen Beobachtungen aus (A) sind schematisch zusammengefasst. In uninfizierten Zellen liegt p53 frei im Kern vor (0.). Ist E1B-55k zugegen, so bindet, inaktiviert und relokalisiert dieses p53 in das Zytoplasma (I.). Zu späteren Zeitpunkten der Adenovi-

rusinfektion ist auch E4 orf6 zugegen. Dieses bildet einen Komplex mit E1B-55k und hilft E1B-55k, p53 zu ubiquitinieren (II.). Durch den einsetzenden proteasomalen Abbau vermindert sich der intrazelluläre Gehalt an p53 stark (III.).

5.2. Eine Punktmutante von E1B-55k ist nicht mehr in der Lage, p53 zu inhibieren.

Es hat verschiedene Versuche gegeben, die Bindestellen von p53 auf der Primärsequenz des E1B-55k zu kartieren (Kao et al., 1990, Yew et al., 1990, Braithwaite et al., 1991, Grand et al., 1999). Die wohl umfassendste Studie hierzu ist eine Arbeit von Shen et al. (Shen et al., 2001). Tatsächlich wurde eine Punktmutante von E1B-55k beschrieben, in der, einzig durch den Austausch des Arginin 239 in einen Alaninrest, die Bindung des E1B-55k an p53 gestört ist. Ein derart mutiertes E1B-55k Protein kann selektiv nicht mehr an p53 binden, wohingegen alle anderen Funktionen des E1B-55k durch diese geringfügige Mutation nicht beeinträchtigt sind. Anders als ein Virus, bei dem das *E1B-55k* Gen deletiert worden ist, unterscheidet sich mutantes Virus, dessen E1B-55k Aminosäuresequenz einzig die Veränderung R239A aufweist, nicht in seinen Wachstumseigenschaften von einem wt-Virus (Shen et al., 2001, Pilder et al., 1986a).

Gemäß unserem Modell für den p53 Abbau in adenovirusinfizierten Zellen, müßte man für ein solches Virus mit dem Arginin 239 nach Alanin Austausch folgendes erwarten: Während in wt-infizierten Zellen das zelluläre p53 sehr effizient und spezifisch abgebaut wird, so sollte in Zellen, die mit einem Virus Ad E1B-55k R239A infiziert wurden, p53 unkontrolliert akkumulieren (Abb. 2). Um diese Hypothese zu testen, haben wir die folgenden zwei Viren nach dem vereinfachten Verfahren nach He et al. hergestellt (He et al., 1998): Ein sogenanntes wt-Virus (Ad wt) und ein parallel hierzu hergestelltes Virus (Ad E1B-55k R239A) mit einer Punktmutation im *E1B-55k* Gen (siehe Materialien & Methoden für Details).

Infiziert man nun Zellen mit zwei wt-p53 Allelen ($p53^{+/+}$) mit den genannten Viren, so findet man folgendes - erwartetes - Ergebnis (Abb. 3A): In uninfizierten Zellen sind grundsätzlich immer nur geringste Mengen p53 nachzuweisen (Abb.

3A, Spur 1). Infiziert man nun mit einem Virus, dessen mutiertes E1B-55k nicht mehr an p53 bindet, so kommt es zu der erwarteten Akkumulation von

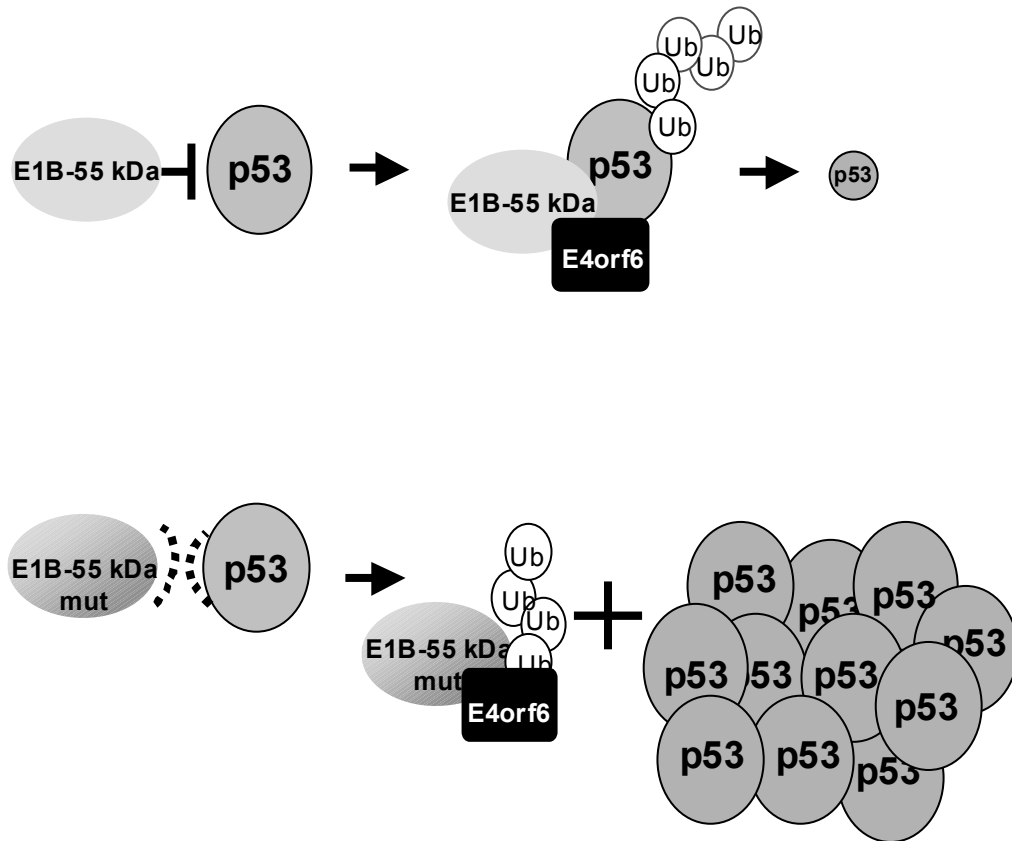


Abb. 2. Arbeitshypothese: massiver p53 Anstieg in Gegenwart von mutiertem E1B-55k. Obere Bildhälfte: wt-E1B-55k, selbst ein p53-Antagonist, bildet zusammen mit E4 orf6 einen funktionellen Ubiquitinligasekomplex, der zur Polyubiquitinylierung von p53 und einer starken Reduktion der p53 Mengen in adenovirusinfizierten Zellen führt. Untere Bildhälfte: Die Mutation R239A verhindert die Bindung von E1B-55k an p53. Zwar kann E1B-55k nach wie vor mit E4 orf6 interagieren, doch es kommt zu keiner Polyubiquitinylierung des p53 mehr. In Zellen, die mit einem solchen mutanten Virus infiziert wurden, müßten die zellulären p53 Mengen unkontrolliert und stark ansteigen.

endogenem p53 in den adenovirusinfizierten Zellen (Abb. 3A, Spur 2). In Ad wt-infizierten Zellen hingegen läßt sich im Western Blot kein p53 nachweisen (Abb. 3A, Spur 3), so, wie dies bereits vielfach beobachtet worden ist (Stee-genga et al., 1998, Koch et al., 2001). Unsere ursprüngliche Hypothese sehen

wir hiermit bestätigt: Kann mutiertes E1B-55k nicht mehr an p53 binden, so führt dies zu einem unkontrollierten Anstieg des p53 in den infizierten Zellen (Abb. 2).

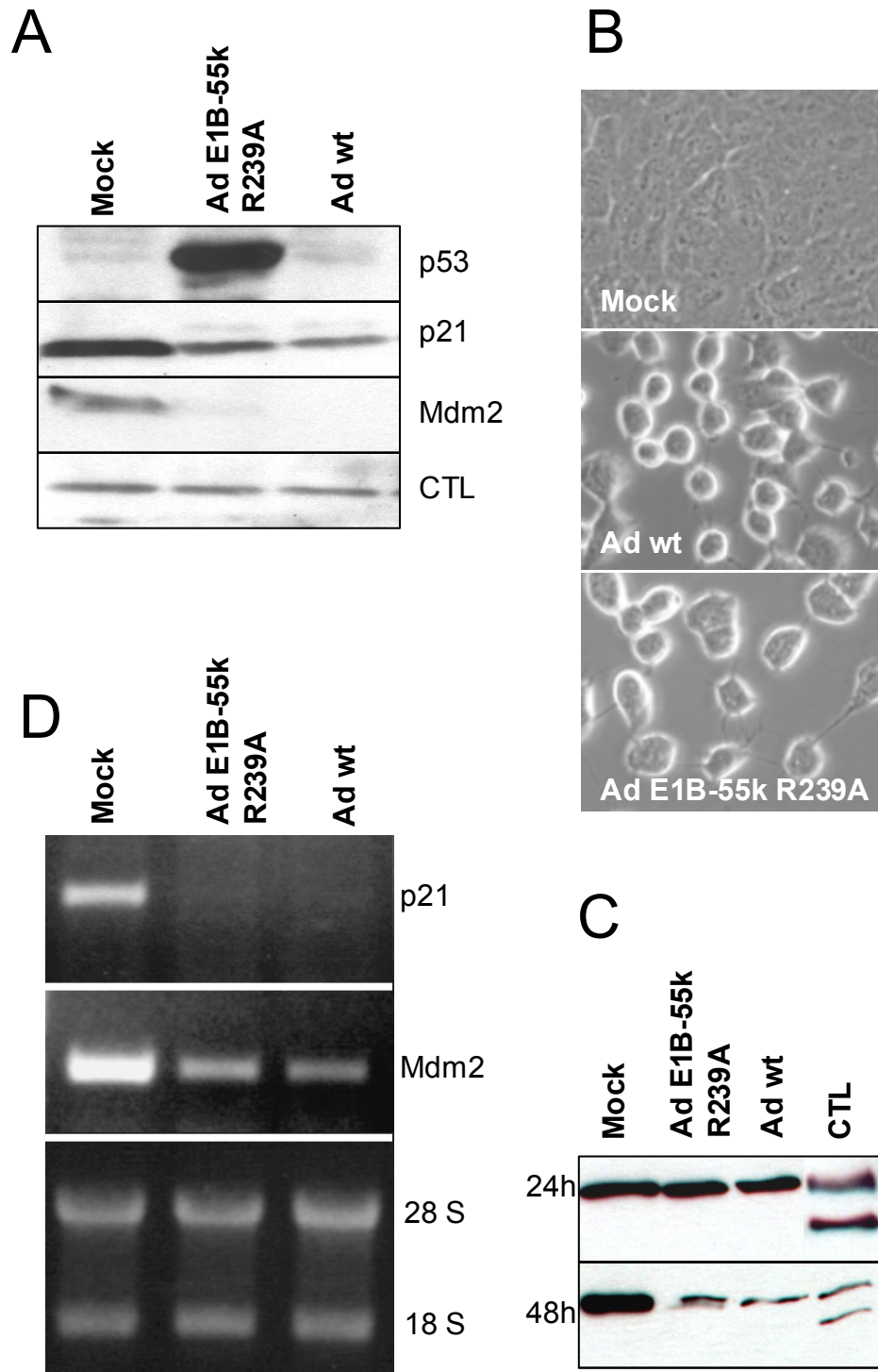


Abb. 3. In Ad E1B-55k R239A infizierten Zellen akkumuliert p53, aber es bleibt transkriptionell inaktiv. (A) A549 Zellen wurden bei einer m.o.i. von 20 entweder mit PBS (Mock), Ad E1B-55k R239A oder Ad wt infiziert. 24h nach Infektion wurden die Zellen in RIPA geerntet, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen p53 (1801/DO-1, oberste Zeile), p21^{Cip-1/WAF-1} (Transduction Laboratories, 2. Zeile), Mdm2 (2A10/3G5, 3. Zeile) gefärbt. Die Ladekontrolle ist eine unspezifische Bande aus dem α p21-Blot bei ca. 70 kDa. **(B)** Die Zellen aus (A) wurden vor der Ernte (24 h p.i.) im Lichtmikroskop betrachtet. **(C)** In einem parallelen Ansatz wurden A549 Zellen infiziert wie in (A) 24 und 48 h p.i. in einem Gemisch aus RIPA und 8 M Harnstoff (1:1 v/v) geerntet, elektrophoretisch getrennt und der Blot mit Antikörpern gegen PARP dekoriert. **(D)** Semiquantitative RT-PCR Analyse von p53 Zielgenen: LS174T Zellen, infiziert wie in (A), wurden 24h p.i. in Trizol geerntet, die RNA isoliert, revers transkribiert und die relativen Produktmengen in einer semiquantitativen PCR analysiert. Die obere Zeile zeigt die relativen Mengen an p21-spezifischen Amplifikaten nach 25 Zyklen, die mittlere Mdm-2-spezifische PCR-Produkte nach 25 Zyklen, darunter ist als Ladekontrolle der relative Gehalt an ribosomaler RNA abgebildet.

Trotz dieser massiven Zunahme des intrazellulären p53 - ausgelöst mit dem Beginn der E1A-Expression (Lowe et al., 1993a) - läßt sich keine, auch nur beginnende Apoptose in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen feststellen (Abb. 3B). Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen lassen sich auch anhand einer Färbung gegen PARP bestätigen (Abb. 3C). PARP oder Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase ist ein Substrat für Caspase-3. Nach der mitochondrialen Festlegung der Zelle auf ihren Tod ist die Effektor-Caspase-3 zwangsläufig an der Ausführung des Zelltods beteiligt. Ist Apoptose eingeleitet, dann entsteht ein charakteristisches PARP-Fragment von ca. 85 kDa Größe (Tewari et al., 1995) (vgl. Abb. 3C, Spur 4).

5.3. Trotz massiver Akkumulation von endogenem p53 in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen bleibt das p53 transkriptionell inaktiv.

Da das in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen massiv akkumulierende p53 gar keine Wirkung in Form einsetzender Apoptose zeigte, stellte sich die Frage, ob denn das zelluläre p53 in den Adenovirus-infizierten Zellen überhaupt aktiv ist. In Abb. 3A ist unterhalb der Färbung gegen p53 eine Färbung des selben Blots gegen p21 und Mdm2 gezeigt. Beide, p21 und Mdm2, sind Produkte bekannter Zielgene des sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors p53 (Kern et al., 1991, Zambetti et al., 1992, El-Deiry et al., 1993, Barak et al., 1993, Wu et al., 1993). Man würde also erwarten, daß die p21- und Mdm2-Mengen parallel zu einer Zunahme der p53 Mengen ebenfalls stark ansteigen. Das Gegenteil ist der Fall. Nicht nur findet man keinen Anstieg der p21- und Mdm2-Mengen in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen, sondern auch gegenüber den uninfizierten Zellen (Abb. 3A, Spur 1) ist der Gehalt an p21 und Mdm2 in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen nochmals reduziert (Abb. 3A, Spur 2).

Mit den winzigen Mengen an endogenem p53 in den uninfizierten Zellen erhält man demnach mehr p21 und Mdm2 als nach Adenovirusinfektion, obwohl in den mit der Punktmutante infizierten Zellen endogenes p53 sehr stark angereichert wird (Abb. 3A, Spur 2, obere Zeile). Die detektierte Menge an p21 und Mdm2 in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen läßt sich nicht unterscheiden von der Menge p21 und Mdm2 aus Ad wt-infizierten Zellen, die gar kein p53 mehr enthalten. Hieraus schließen wir: Zwar ist p53 in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen überreichlich vorhanden, aber es ist nicht transkriptionell aktiv.

Um ausschließen zu können, daß es sich bei dem beobachteten Effekt - kein Anstieg der zellulären p21- und Mdm2-Mengen trotz p53-Akkumulation - nicht, wie bereits beschrieben (Kebusek et al., 1999, Chattopadhyay et al., 2001), um einen direkten Effekt des E1A-Proteins auf das p21 Protein handelt, haben wir eine semi-quantitative RT-PCR Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3D gezeigt. Man erkennt deutlich, daß sich der zuvor im Westernblot beobachtete Effekt auch auf Ebene der mRNA Induktion der p53-Zielgene *p21* und *Mdm2* nachvollziehen läßt. Trotz der großen Mengen an p53 Protein in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen finden wir keinen Anstieg der mRNA-

Mengen gegenüber uninfizierten Zellen (Mock) (Abb. 3D, vgl. Spur 2 und Spur 1). Die Mengen an p21 und Mdm2 mRNA in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen sind ebenso groß wie man sie in Ad-wt-infizierten Zellen findet, obwohl letztere aufgrund des spezifischen Abbaus von p53 durch frühe adenovirale Proteine überhaupt kein detektierbares p53 mehr enthalten (Abb. 3D, vgl. Spur 2 und Spur 3). Ohne hierfür eine Erklärung liefern zu können, müssen wir feststellen: p53 ist in adenovirusinfizierten Zellen gar nicht transkriptionell aktiv. Möglicherweise fehlt ihm ein Kofaktor oder eine posttranslationale Modifikation, die für seine Funktion als Transkriptionsfaktor nötig wären.

5.4. In Gegenwart von singular exprimiertem E1B-55k R239A ist p53 transkriptionell aktiv, doch gilt dies nicht im Kontext einer viralen Infektion.

Nun stellte sich die Frage: Warum ist das endogene, zelluläre p53 in den adenovirusinfizierten Zellen nicht transkriptionell aktiv? Shen et al. hatten in ihrer Arbeit (Shen et al., 2001) zwar gezeigt, daß E1B-55k R239A nicht mehr an p53 binden kann. Sie hatten jedoch keine Untersuchungen dazu angestellt, ob ein derart mutiertes E1B-55k eine transkriptionelle Induktion der p53-Zielgene wieder zuläßt bzw. nicht mehr verhindert. Wir haben hierzu *in vitro* einen Reportergenversuchsansatz etabliert. Transfiziert man das Plasmid pGl3-BP100Luc, ein Feuerfliegen-Luziferasegen unter Kontrolle des p53-induzierbaren Mdm2-Promotors, zusammen mit einem p53-Expressionsplasmid in Zellen, so findet man eine sehr starke Induktion der Enzymaktivität (Abb. 4A, vgl. Spur 2 und Spur 1), gemessen an seinem Substratumsatz (siehe Materialien & Methoden für Details).

Anders verhält es sich in Gegenwart von wt-E1B-55k. Transfiziert man zusätzlich zu dem Luziferase-Reportergenkonstrukt und einem p53-Expressionsplasmid einen deutlichen Überschuß eines E1B-55k-Expressionsplasmids, so ist die meßbare Enzymaktivität auf ein Zehntel des Wertes in Abwesenheit von wt-E1B-55k zurückgefallen (Abb. 4A, Spur 3, logarithmische Skala) (siehe auch Yew et al., 1992). Exprimiert man neben wt-E1B-55k zusätzlich auch noch wt-

E4orf6, so läßt sich keine Induktion des unter einem p53-abhängigen Promotor geschalteten Reportergens mehr feststellen (Abb. 4A, vgl. Spur 4 mit Spur 1).

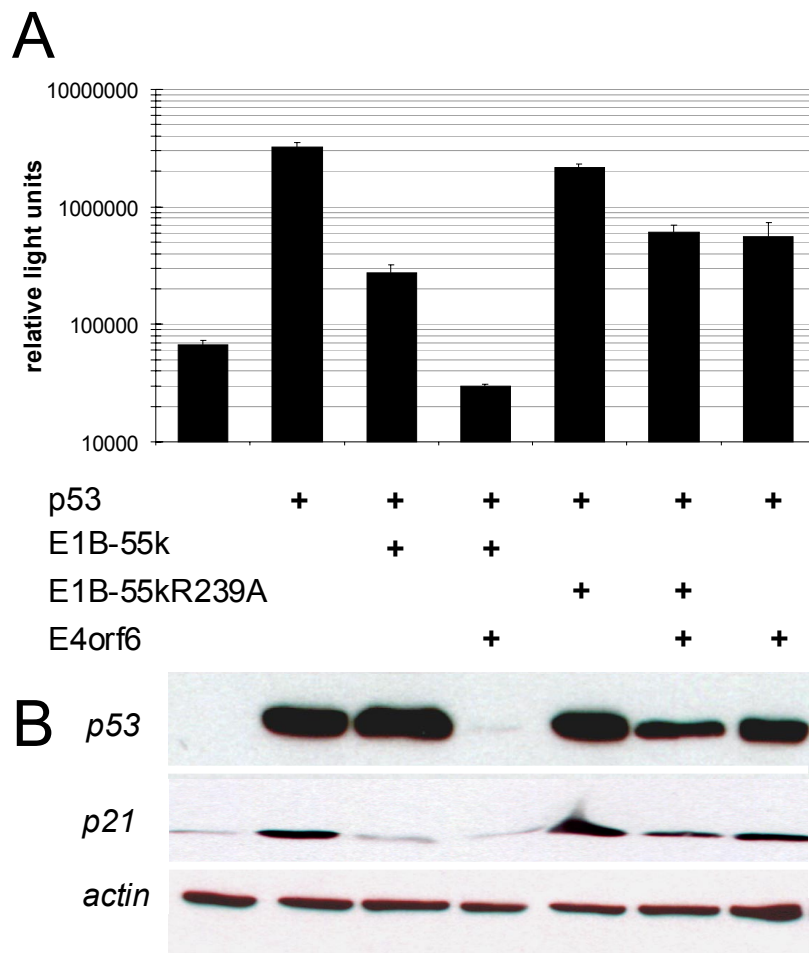


Abb. 4. E1B-55k R239A hat keinen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität von p53. (A). p53^(-/-) H1299 Zellen wurden mit 50 ng Reporterplasmid pGl3-BP100Luc transfiziert. Wo angegeben (alle außer Spur 1) wurden zusätzlich 50

ng pRcp53 transfiziert (Lipofectamin 2000) und zwar entweder in Kombination mit den respektiven Stufferplasmiden pcDNA.3- β Gal, pCGN- β Gal bzw. pCMV- β Gal oder mit 350 ng (750 ng) pCGN-E1B (pCMV-E4orf6), wie unter der Graphik skizziert. 24 h p.t. wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt, wie beschrieben. Die gezeigten Daten beziehen sich auf ein repräsentatives Experiment in Dreifachausführung. **(B)** Ein paralleler Transfektionsansatz wurde in RIPA lysiert und der SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Die Membran wurde gegen p53, p21^{Cip-1/WAF-1} und Aktin gefärbt.

Verwendet man aber anstelle von wt-E1B-55k die Punktmutante E1B-55k R239A, welche in der Immunpräzipitation nicht mehr an p53 zu binden vermag, so findet man nur eine unwesentliche Beeinträchtigung der p53-vermittelten Reportergenaktivierung (Abb. 4A, Spur 5) im Vergleich mit dem Ansatz ohne E1B-55k (Abb. 4A, Spur 2). Sogar nach Zusatz des E4 orf6-exprimierenden Plasmids, wodurch der funktionelle Ubiquitinligasekomplex komplettiert wird, findet man für die Kombination E1B-55k R239A und E4 orf6 immer noch eine deutlich meßbare p53-Aktivität (Abb. 4A, Spur 6), die um Logstufen besser ist, als die gemessene Aktivität für die Kombination wt-E1B-55k mit E4 orf6 (Abb. 4A, Spur 4). Die beobachtete Verminderung der p53-Aktivität in dem Ansatz E1B-55k R239A plus E4 orf6 läßt sich alleine aus der Anwesenheit des E4 orf6 erklären (Abb. 4A, vgl. Spur 6 mit Spur 7). Der inhibierende Einfluß des E4 orf6 Proteins auf die p53-Aktivität war bereits im Vorfeld beobachtet worden (Dobner et al., 1996).

Die Lysate des Luziferaseversuchs aus Abb. 4A wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gegen p53, p21 und Aktin gefärbt (Abb. 4B). Hier wurde also nun der Einfluß von E1B-55k auf die Induktion endogener, in Euchromatin eingebetteter p53-Zielgene untersucht. Man erkennt, daß p53 durch die Kombination aus E1B-55k R239A und E4 orf6 nicht mehr abgebaut werden kann (Abb. 4B, Spur 6), ganz im Gegensatz zu dem Ansatz mit wt-E1B-55k, welches, wenn mit E4 orf6 komplettiert, das transfizierte p53 vollständig verschwinden läßt (Abb. 4B, Spur 4).

In der Färbung gegen p21, also einem repräsentativen p53-induzierbaren Genprodukt, sehen wir, daß in Gegenwart von wt-E1B-55k dieses endogene

p21 nicht induziert werden kann, obwohl p53 ausreichend vorhanden wäre (Abb. 4B, Spur 3). Anders ist dies bei Anwesenheit von E1B-55k R239A. Dort bleibt das p53 auch in Gegenwart der Punktmutante E1B-55k R239A aktiv (Abb. 4B, Spur 5). Selbst in Gegenwart von E4 orf6 bleibt p53 in der Lage, das zelluläre p21 Gen zu induzieren (Abb. 4B, Spur 6 und Spur 7). Insgesamt möchten wir aus den *in vitro* Versuchen mit singular exprimiertem E1B-55k R239A und E4 orf6 Protein folgendes schließen: Die Punktmutante E1B-55k R239A behindert die Aktivierung der p53-Zielgene nicht mehr. Auch in Gegenwart von E4 orf6 kann die E1B-55k-Mutante R239A p53 nicht mehr abbauen.

5.5. Eine Punktmutation reduziert die inhibitorische Wirkung von E1A auf die transkriptionelle Induktion von p53 Zielgenen.

In den *in vitro* Versuchen mit transfizierten E1B-55k Plasmiden schien es so, als ob E1B-55k R239A eine transkriptionelle Induktion von p53-Zielgenen zu lassen würde (Abb. 4). Dem stehen unsere Beobachtungen aus der *in vivo* Situation entgegen, wo wir zeigen konnten, daß in den Zellen, die mit der Mutante Ad E1B-55k R239A infiziert wurden, das akkumulierte p53 eben nicht transkriptionell aktiv ist (Abb. 3A, Abb. 3D). Dieser Widerspruch läßt vermuten, daß ein weiteres adenovirales Genprodukt, in den Transfektionsversuchen fehlend, auf dem viralen Genom jedoch vorhanden, für die in den virusinfizierten Zellen ausbleibende transkriptionelle Aktivierung durch p53 verantwortlich ist. Ein guter Kandidat hierfür sind die beiden unmittelbar frühen Genprodukte des *E1A* Gens.

Von E1A ist beschrieben worden, daß es an p300 bindet (Howe et al., 1990). p300, eine Histonacetyltransferase (Ogryzko et al., 1996), bindet an p53 (Lill et al., 1997b, Avantaggiati et al., 1997), einen sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor (Yew et al., 1992, Kern et al., 1991, Fields et al., 1990, Raycroft et al., 1990). p300 ist ein notwendiger Kofaktor für die RNA-Pol II-vermittelte Induktion der p53-Transgene (Avantaggiati et al., 1997, Scolnick et al., 1997). In *in vitro* Reporter-genversuchen kann die zusätzliche Anwesenheit von p300 die Aktivierung der p53-Zielgene stark verstärken (Lee et al., 1998, Lill et al., 1997b).

Unsere Arbeitshypothese ist in Abb. 5 zusammengefaßt. Sie zeigt auch, daß das virale Genprodukt E1A neben der Histonacetyltransferase p300 zusätzlich noch den p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF) zu binden und zu inaktivieren vermag (Yang et al., 1996). PCAF wiederum vermittelt, ebenso wie p300, die Acetylierung von p53 (Sakaguchi et al., 1998). Diese post-translationale Modifizierung von p53 erleichtert es p53, als Transkriptionsfaktor zu wirken (Liu et al., 1999).

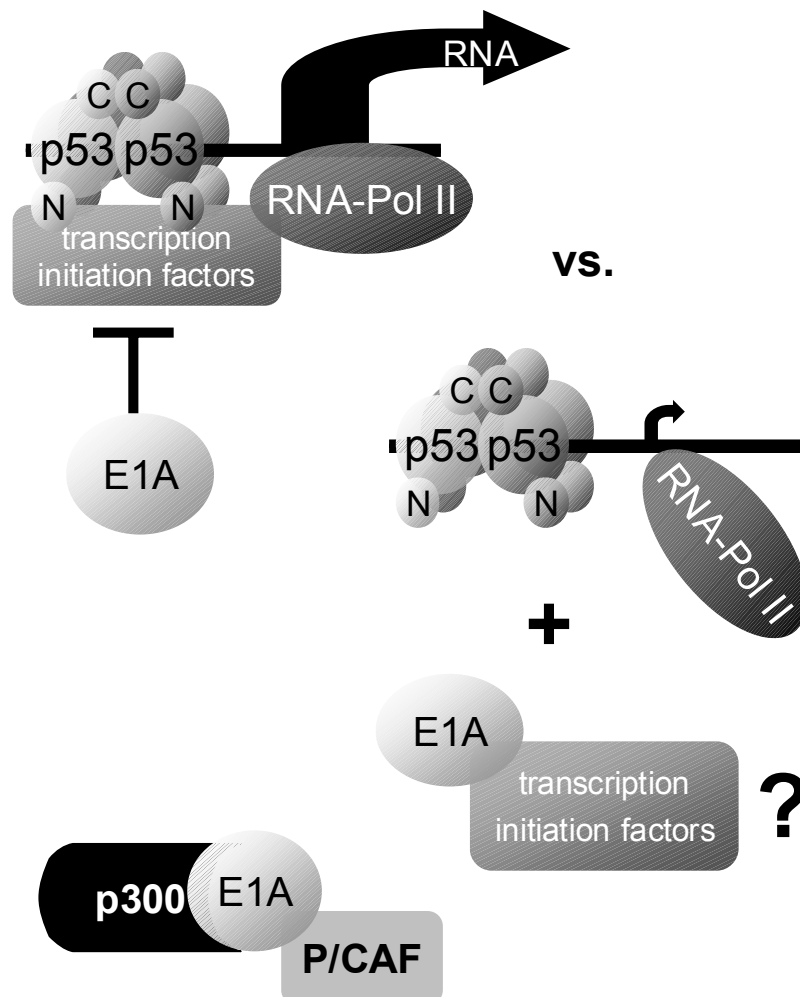


Abb. 5. E1A könnte zu der transkriptionellen Inaktivität von p53 beitragen, denn es bindet an den notwendigen Kofaktor p300. Die Schemazeichnung zeigt, daß p53 als Tetramer an DNA bindet. Transkriptionsinitiationsfaktoren und transkriptionelle Ko-Aktivatoren binden an die N-terminale Transkaktivierungsdomäne von p53. Diese Kofaktoren wiederum rekrutieren den RNA Pol II Holoenzymkomplex, der für die Transkription der p53-induzierbaren Gene benötigt wird.

Das sehr frühe virale Genprodukt E1A bindet an p300 und PCAF. Beides sind Aktivator von p53, die seine Stabilität und transkriptionelle Aktivität positiv beeinflussen. Wir vermuten, daß in Gegenwart von E1A-Expression diese Transkriptionshilfsfaktoren wegtitriert werden. Gebunden und inaktiviert durch E1A stehen diese dem DNA-gebundenen p53 nun nicht mehr zur Verfügung, um die Transkription der p53-Zielgene zu verstärken.

Mit Hilfe unseres p53-induzierbaren Reportergenansatzes aus Abschnitt 5.4. haben wir nun versucht, folgende Frage zu beantworten: Können wir eine Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität von p53 in Gegenwart von ko-transfiziertem E1A feststellen? Die Ergebnisse zeigt Abb. 6A. Bei Zugabe steigender Mengen von wt-E1A nimmt die Fähigkeit von p53, seine Zielgene zu aktivieren, immer weiter ab (Abb. 6A, vgl. Spur 2, Spur 3 und Spur 4). Wird nun an Stelle von wt-E1A eine Mutante von E1A transfiziert, die p300 nicht mehr zu binden vermag (Wang et al., 1993, Somasundaran et al., 1997, Stein et al., 1990), so läßt sich zwar immer noch eine Reduzierung transkriptionellen Aktivität von p53 feststellen, bei gleicher Konzentration ist sie gegenüber wt-E1A jedoch deutlich vermindert (Abb. 6A, vgl. Spur 5 und Spur 3, sowie Spur 6 und Spur 4). Insgesamt hat die nunmehr fehlende Funktionalität des mutierten E1A, an p300 binden zu können, dem p53 geholfen, seine Zielgene effizienter induzieren zu können. Die Inaktivierung von p300 durch das adenovirale Genprodukt E1A trägt also mit dazu bei, die transkriptionelle Aktivierung der p53-Zielgene zu minimieren.

Wir haben daraufhin ein Virus konstruiert, bei dem neben der Punktmutation in E1B-55k, die dazu geführt hat, daß E1B-55k nicht mehr an p53 zu binden vermag, auch in dem Genprodukt des *E1A* Gens ein einzelner Aminosäureaustausch von Arginin 2 nach Glycin stattgefunden hat. In einem solchen doppelt mutanten Virus Ad E1B-55k R239A.E1A R2G kann das E1A Protein nicht mehr an p300 binden. Das zelluläre p300 stünde dem p53 somit auch in den virusinfizierten Zellen weiterhin zur Verfügung. Abb. 6B zeigt den immunologischen Nachweis von p53 und seinem Zielgen p21 in solchen Ad E1B-55k R239A.E1A R2G-infizierten Zellen. Man erkennt, daß auch in den mit der Doppelmutante infizierten Zellen p53 massiv akkumuliert (Abb. 6B, Spur 2), aber nicht aktiv ist (Abb. 6B, untere Hälfte, vgl. Spur 2 und Spur 4). *In vivo* bleibt somit, gemessen an der Induktion des Zielgens p21, p53 auch in den Ad E1B-55k R239A.E1A R2G-infizierten Zellen transkriptionell inaktiv (Abb. 6B, vgl. Spur 2 und Spur 4). Die Elimination der p300-Bindung aus dem E1A war somit nicht ausreichend,

um in den virusinfizierten Zellen die transkriptionelle Aktivität des p53 zu rekonstituieren.

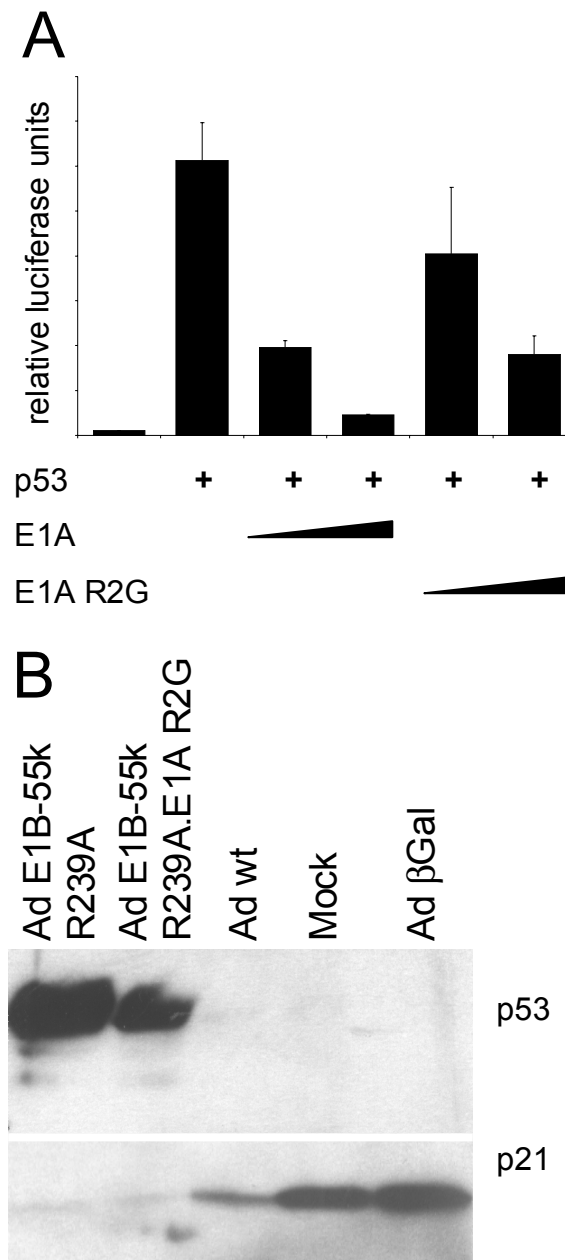


Abb 6. Wt-E1A supprimiert die transkriptionelle Induktion eines p53-aktivierbaren Reportergens. Eine Punktmutante von E1A, R2G, welche nicht mehr an p300 bindet, reduziert die p53-vermittelte Transgenexpression weniger stark. (A) H1299 Zellen wurden mit dem p53-responsiven Reporterkonstrukt pGl3-BP100Luc transfiziert, entweder alleine (Spur 1) oder in Kombination mit 50 ng pCp53 (Spur 2). In Spur 3 und Spur 4 wurden steigende Men-

gen pcDNA.3-E1A-13S zugegeben (300 ng und 1100 ng), in Spur 5 und Spur 6 hingegen wurde mit einem Expressionsvektor für die Punktmutante E1A-13S R2G komplettiert (300 ng und 1100 ng). Die zu transfizierenden DNA Mengen wurden mittels pcDNA.3-βGal abgeglichen. 24 h p.t. wurden die Transfektionsansätze in Reporterlysispuffer geerntet und der Substratumsatz photometrisch bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt eine repräsentative Dreifachbestimmung. **(B) Keine Wiederherstellung der p53-Zielgeninduktion in Ad E1B-55k R239A.E1A R2G infizierten Zellen.** A549 Zellen wurden mit den angeführten Viren mit einer m.o.i. = 20 infiziert. Dem Virus in Spur 1 fehlt die p53-Bindung durch E1B-55k, dem Virus aus Spur 2 zusätzlich die p300-Inaktivierung durch E1A. Spur 3 ist ein wt-Virus, Spur 5 ein nicht replikationsfähiger Erstgenerationsvektor. 24 h p.i. wurden die Zellen in RIPA geerntet, die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und der Western Blot gegen p53 und p21 gefärbt.

5.6. Eine residuäre Bindung des mutierten E1B-55k R239A an p53 kann – soweit vorhanden – nicht für die transkriptionelle Inaktivität des endogenen p53 verantwortlich gemacht werden.

Nach den Befunden aus Abb. 3A war das zelluläre p53 in den adenovirusinfizierten Zellen transkriptionell inaktiv, obwohl es in den Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen massiv akkumulierte. Dieser Befund konnte für alle anderen untersuchten p53^(+/+) Zelllinien bestätigt werden, so daß es sich um ein allgemeines Phänomen zu handeln scheint (nicht gezeigt für HFF-Noah, MRC-5, U2OS, HCT-116 und HUVEC). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wäre, daß die eingeführte Punktmutation R239A in der Primärsequenz von E1B-55k nicht ausreicht, um die Bindung an p53 vollständig zu eliminieren. Die Aussage von Shen et al., E1B-55k R239A binde nicht mehr an p53, beruht auf der experimentellen Unfähigkeit, p53 mit Hilfe der Mutante E1B-55k R239A kopräzipitieren (Shen et al., 2001). Es ist gut vorstellbar, daß eine Rest-Bindeaktivität des E1B-55k R239A an p53, die sich der Detektion in der Koimmunpräzipitation entzieht, in der *in vivo* Situation dennoch ausreicht, um die transkriptionelle Aktivierung der p53-Zielgene zu verhindern.

Um ausschließen zu können, daß eine verbleibende leichte Assoziation des E1B-55k R239A für die Inaktivität des p53 in den virusinfizierten Zellen verantwortlich ist, haben wir die Induktion der p53-Zielgene in Zellen untersucht, die

mit einem Virus infiziert wurden, dem das E1B-55k Genprodukt komplett fehlt (Ad Δ E1B-55k oder *d/338*, siehe Materialien & Methoden für Details). Die Ergebnisse sind in Abb. 7 gezeigt. Im Vergleich zu den mit Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen scheint die Akkumulation des zellulären p53 in den Ad Δ E1B-55k-infizierten Zellen eher noch etwas stärker (Abb. 7A, vgl. Spur 2 mit Spur 4).

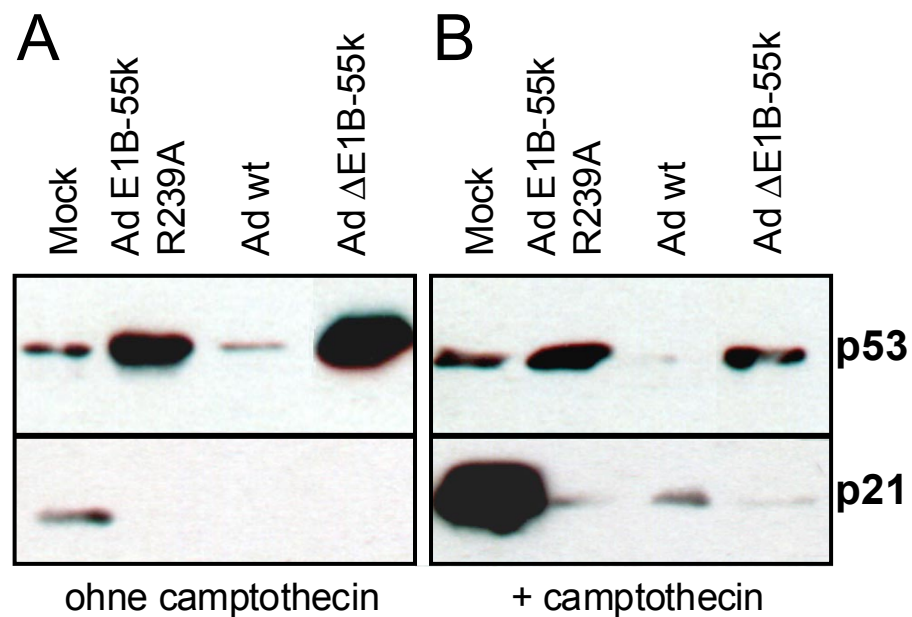


Abb. 7. Repression der p53-Zielgene trotz p53-Akkumulation auch in völliger Abwesenheit von E1B-55k. (A) LS174T Zellen wurden 24 h nach Infektion (m.o.i. = 20) mit Ad E1B-55k R239A, Ad wt oder Ad Δ E1B-55k bzw. Mock geerntet und der p53 bzw. p21-Gehalt der Lysate im Westernblot analysiert. **(B)** Ein zu (A) identischer Ansatz wurde zur Stimulation des endogenen p53-Antwort für 3 h p.i. mit 287 nM Camptothecin behandelt, geerntet und weiterbearbeitet wie in (A).

In der darunter gezeigten Färbung gegen p21 erkennt man, daß auch in der kompletten Abwesenheit des viralen p53-Antagonisten E1B-55k keine Induktion der p53-Zielgene feststellbar ist (Abb. 7A, Spur 4). Eine wie auch immer gear-

tete residuäre Bindung von E1B-55k R239A an p53 kann somit als Erklärung für die transkriptionelle Stille von p53 ausgeschlossen werden.

Eine Eigenschaft der hier verwendeten LS174T-Zellen ist es, daß man p53 durch die Zugabe von Camptothecin stimulieren kann (Tishler et al., 1993). Wie in der unteren Hälfte von Abb. 7 gezeigt, führt die Aktivierung von p53 über eine durch die DNA-Schäden induzierte Proteinkinase-Kaskade zu einer deutlichen Verstärkung der transkriptionellen Aktivität von p53, aber nur in den uninfizierten Zellen (vgl. Abb. 7A, Spur 1 mit Abb. 7B, Spur 1). In den adenovirusinfizierten Zellen bleibt die durch Camptothecin eingeleitete Steigerung der transkriptionellen Aktivität von p53 aus (gemessen als p21-Induktion, Abb. 7B, Spur 2,3 und 4), und zwar auch bei vollständiger Abwesenheit von E1B-55k (Abb. 7B, Spur 4). Ein anlagerndes Abschirmen von E1B-55k R239A an den *N*-Terminus von p53 kann somit als Grund für die Inhibition von p53 ausgeschlossen werden. Hingegen wird p53 offenbar durch einen anderen Mechanismus inaktiviert.

5.7. Die aktivierende Phosphorylierung von p53 wird im Rahmen einer Adenovirusinfektion nicht beeinträchtigt.

DNA-Schäden, wie sie zum Beispiel durch Zugabe von Camptothecin erzeugt werden können (Mattern et al., 1987), führen zu einer Zunahme des intrazellulären p53 (Tishler et al., 1993). Über eine Reihe von Proteinkinasen, besonders Chk1 und Chk2, aber auch direkt über ATM und ATR, wird p53 an den Serinresten 15 und 20 phosphoryliert und hierdurch aktiviert (Shieh et al., 2000, Khanna et al., 1998, Tibbets et al., 1999). Eine mögliche Erklärung, warum p53 in den adenovirusinfizierten Zellen transkriptionell inaktiv ist, könnte sein, daß das Virus diese zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 notwendige Phosphorylierung (Shieh et al., 1997, Turenne et al., 2001) zu unterbinden weiß. Oder aber das Virusgenom aktiviert oder kodiert für eine Proteinphosphatase, welche die vorzunehmende Phosphorylierung an den p53 Molekülen rasch wieder entfernt.

Mittels eines phosphospezifischen Antikörpers haben wir daher den Phosphorylierungsstatus von p53 in den virusinfizierten Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 gezeigt. Für alle untersuchten Viren gibt es eine strenge Korrelation zwischen den Phospho-p53-Mengen und den Gesamtmengen an p53 in den infizierten Zellen. Eine Verhinderung der aktivierenden Phosphorylierung von p53 an Serin-15 durch Adenovirusinfektion scheidet somit als Erklärungsmöglichkeit für die fehlende p53-Aktivität aus. Wenn überhaupt ist das p53 in den virusinfizierten Zellen eher mehr phosphoryliert als in uninfizierten Zellen (Abb. 8, vgl Spur 1 und 2 sowie Spur 5 und 6, oberste und zweitoberste Zeile).

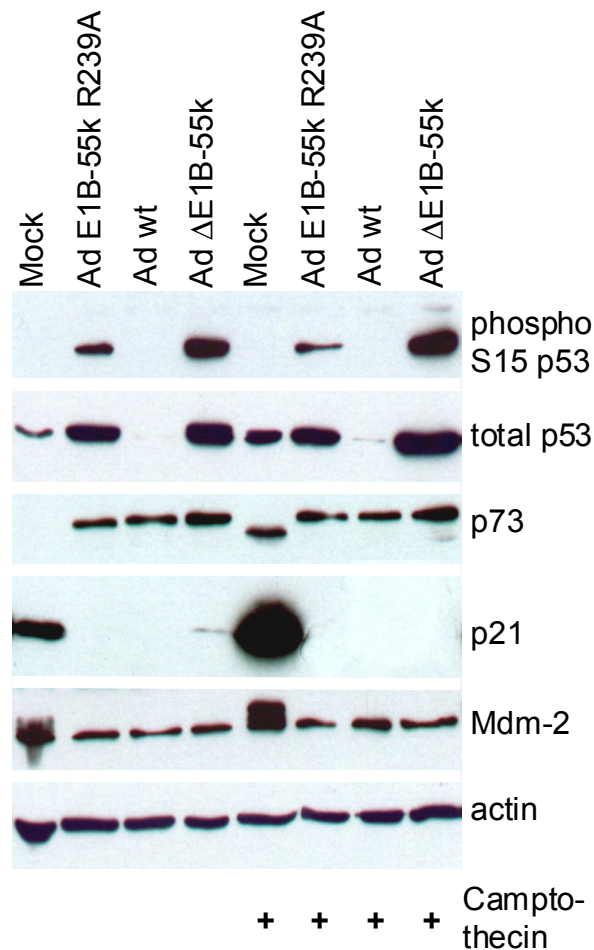


Abb. 8. Adenovirusinfektion verhindert nicht die aktivierende Phosphorylierung von p53. LS174T Zellen, uninfiziert oder infiziert mit Ad E1B-55k R239A, Ad wt oder Ad ΔE1B-55k (m.o.i. = 20), wurden ab Infektion für 3h mit 0,1% DMSO oder 287 nM Camptothecin behandelt. 24 h nach Infektion wurden die Zellen in RIPA geerntet und im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die

Membranen wurden nacheinander gegen phospho-p53, gesamt p53, p73, p21, Mdm-2 und Aktin gefärbt.

5.8. Eine kompetitive Absättigung der p53-Bindestellen durch p73 Δ N scheidet als Erklärungsmöglichkeit für die transkriptionelle Stille von p53 aus.

Es existieren zwei etablierte negative Rückkopplungsschlaufen für p53, die seine wachstumsarretierende und Apoptose-induzierende Aktivität hemmen, zumindest im Grundzustand der Zellen (Momand et al., 1992, Wu et al., 1993, Grob et al., 2001, Yang et al., 1998). Eine dieser negativen Rückkopplungsschlaufen verläuft über Mdm-2, eine zelluläre, p53-spezifische E3-Ubiquitinligase, die endogenes p53 kontinuierlich destabilisiert (Honda et al., 1997, Haupt et al., 1997b, Kubbutat et al., 1997). Da andererseits *Mdm-2* auch ein p53-Zielgen ist, kann bei Bedarf deutlich mehr dieses p53-Antagonisten hergestellt werden (1. negative Rückkopplungsschleufe) (Barak et al., 1993, Wu et al., 1993).

Eine ähnliche negative Rückkopplungsschleufe existiert mit Hilfe von p73 Δ N (Fillippovich et al., 2001, Grob et al., 2001, Stiewe et al., 2002, Kartasheva et al., 2002). p73 ist ein Homologes von p53 (Kaghad et al., 1997), das an identische, zumindest aber überlappende DNA-Erkennungssequenzen binden kann (Di Como et al., 1999). Auch p73 ist ein Transkriptionsfaktor und kann typische p53-aktivierbare Gene induzieren (Jost et al., 1997, Gaiddon et al., 2001). Besonders in Abwesenheit von p53 kann es dieses mitunter funktionell ersetzen (Sayan et al., 2001, Zhu et al., 1998).

Von p73 jedoch existieren *N*-terminale Verkürzungsisoformen, p73 Δ N, denen die transkriptionsaktivierende Domäne fehlt (Grob et al., 2001), während sie weiterhin an die p53-spezifischen DNA-Erkennungssequenzen binden (Stiewe et al., 2002). Diese Δ N-Varianten von p73, welche unter der transkriptionellen Kontrolle von p53 stehen (Grob et al., 2001, Kartasheva et al., 2002), können somit p53 funktionell antagonisieren und p53-vermittelte Genexpression wirk-

sam unterbinden (Fillippovich et al., 2001, Stiewe et al., 2002), weil sie die gemeinsame DNA-Erkennungssequenz kompetitiv blockieren. Herpesviren benutzen eine solche Strategie, p73 Δ N-Varianten zu induzieren, um p53 funktionell auszuschalten (Allart et al., 2002).

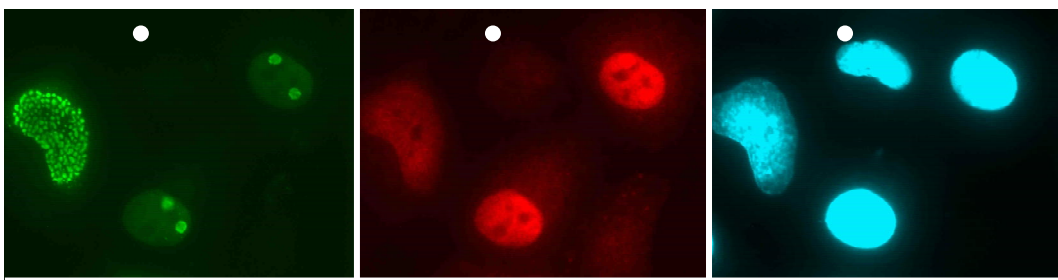
Deshalb haben wir gefragt: Kann eine eventuelle Adenovirus-induzierte Überexpression der p53-Antagonisten p73 Δ N bzw. Mdm-2 die transkriptionelle Inaktivität des p53 in den virusinfizierten Zellen erklären? Die Antwort ist in Abb. 8 gezeigt. Die drittoberste Zeile zeigt eine Färbung von Lysaten adenovirusinfizierter Zellen gegen p73. Man erkennt, daß alleine durch Adenovirusinfektion p73 verstärkt exprimiert wird (Abb. 8 drittoberste Zeile, vgl. Spur 1 mit den Spuren 2, 3, 4). Allerdings handelt es sich hierbei um volle Länge p73, also die transkriptionell aktive Spleißvariante. Erst bei Stimulation der Zellen mit Camptothecin entsteht p73 Δ N, jener Kompetitor für die DNA-Erkennungssequenzen von p53 (Abb. 8 drittoberste Zeile, Spur 5). Dieser Teil des Regelkreislaufs ist also nach wie vor intakt: Transkriptionell aktives p53 kann die Δ N-Variante von p73 induzieren (Abb. 8, vergleiche den darunter abgebildeten Blot gegen p21 als Maß für die transkriptionelle Aktivität von p53). In den virusinfizierten Zellen hingegen findet man auch bei Stimulation mit Camptothecin nur volle Länge p73 (Abb. 8, drittoberste Zeile, Spuren 6 bis 8). Die transkriptionelle Stille von p53 in den virusinfizierten Zellen kann somit nicht über eine übermäßige Akkumulation von p73 Δ N erklärt werden.

Für den anderen p53-Antagonisten, Mdm-2, gilt Analoges (Abb. 8, zweitunterste Zeile). Erst transkriptionell aktives p53 vermag seinen eigenen negativen Regulator zu induzieren und nicht umgekehrt, der in virusinfizierten Zellen überreichlich vorhandene p53-Antagonist Mdm-2 ubiquitiniert jegliches verfügbares p53 (Abb. 8, zweitunterste Zeile). Eine vermutete globale und massive Induktion von Mdm-2 durch die Virusinfektion kann wiederum nicht als Erklärung für die transkriptionelle Inaktivität des p53 dienen.

5.9. Eine Relokalisation des p53 in den virusinfizierten Zellen kann nicht für die transkriptionelle Inaktivität von p53 verantwortlich gemacht werden.

Für p53 ist beschrieben worden, daß es an einzelsträngige DNA bindet (Selinova et al., 1996). Zumindest gilt dies unter *in vitro* Bedingungen. Im Rahmen einer Adenovirusinfektion ist einzelsträngige DNA, etwas für die Zelle sehr ungewöhnliches, mit Beginn der viralen DNA Replikation (ab 20 h p.i.) in großer Menge anzutreffen. Man konnte daher annehmen, daß die beobachtete fehlende Aktivität des p53 mit einem Binden des p53 an einzelsträngige DNA und nachfolgender Relokalisation zusammenhängen könnte. Die einzelsträngige virale DNA befindet sich in sogenannten viralen Replikationszentren und wird dort durch das virale Protein E2A stabilisiert.

Ad wt, 26h p.i.



Ad E1B 55k R239A, 26h p.i.

Abb. 9. p53 wird nicht in die viralen Replikationszentren relokalisiert. A549 Zellen wurden entweder mit Ad wt (obere Zeile) oder Ad E1B-55k R239A (untere Zeile) infiziert (m.o.i. = 2). Die nach 26 h mit Paraformaldehyd fixierten Zellen wurden parallel gegen das virale DNA-bindende Protein E2A (Hybrido-

maüberstände B6.8, Ziege- α -Maus Alexa Fluor 488 - grün, linke Spalte) sowie gegen p53 (Kanninchenserum fl393, Ziege- α -Kanninchen Alexa Fluor 594 - rot, mittlere Spalte) gefärbt. Die nukleäre DNA wurde mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz, rechte Spalte).

In der linken Spalte von Abb. 9 ist eine Immunfärbung von infizierten Zellen gegen das virale E2A Protein gezeigt. Mit Beginn der DNA-Replikation sammelt sich das E2A in sphärischen Strukturen, den viralen Replikationszentren. Würde p53 ebenfalls an einzelsträngige DNA binden, so müßte es in diese viralen Replikationszentren rekrutiert werden. Eine solche Kolokalisation des akkumulierten p53 mit einzelsträngiger DNA in die viralen Replikationszentren konnten wir nicht beobachten. Abb. 9 mittlere Spalte zeigt eine Gegenfärbung der infizierten Zellen gegen p53. Man erkennt klar die Akkumulation des endogenen p53 in den Zellkernen der mit dem mutanten Virus Ad E1B-55k R239A infizierten Zellen (Abb. 9, untere Zeile). Doch p53 bleibt gleichmäßig über den Zellkern verteilt, es liegt nicht in den Replikationszentren gebunden vor (Abb. 9, untere Zeile). Eine räumliche Sequestration des p53 in E2A-positive Strukturen kann somit als Erklärung für die transkriptionelle Inaktivität von p53 ausgeschlossen werden.

5.10. Die zusätzliche Deletion des anti-apoptotischen Proteins E1B-19k aus dem viralen Genom führt zu einer verstärkten Apoptose in den virusinfizierten Zellen.

Für das Auslösen der p53-vermittelten Apoptose scheint eine transkriptionelle Aktivität von p53 nicht immer erforderlich (Haupt et al., 1995, Haupt et al., 1997a, Marchenko et al., 2000, Regula et al., 2001, Mihara et al., 2003, Ding et al., 2000). Demnach müßten die Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen - in ihnen akkumuliert endogenes p53 (Abb. 3A, Abb. 7) - massiv in Apoptose gehen. Dies tun sie aber nicht (Abb. 3B, Abb. 3C). Man könnte daher vermuten, daß es in dem adenoviralen Genom einen weiteren p53-Antagonisten gibt. Solch ein - viertes - adenovirales Protein, welches die negativen Folgen einer p53-Akkumulation unterbinden kann, muß gar nicht notwendigerweise direkt mit p53

interagieren. Ein guter Kandidat ist daher E1B-19k, das Produkt eines kleinen, überlappenden Leserahmens zu E1B-55k (Bos et al., 1981). Von E1B-19k ist beschrieben, daß es ein virales Analogon zu dem zellulären Protein bcl-2 ist (Chiou et al., 1994, Huang et al., 1997). Bcl-2 und E1B-19k binden beide an aktiviertes bak und bax und können auf diese Art und Weise eine Depolarisation der Mitochondrien verhindern (Farrow et al., 1995, Han et al., 1996, Huang et al., 1997). Eine solche Depolarisation der Mitochondrien - verbunden mit der Freigabe von cytochrom c - ist auch in der p53-vermittelten Apoptose notwendig, um die Effektor-Caspasen zu aktivieren (Liu et al., 1996, Kluck et al., 1997). E1B-19k ist in der Lage, eine solche p53-vermittelte Apoptose zu antagonisieren (Han et al., 1996, Yang et al., 1997).

Wir haben daher den offenen Leserahmen E1B-19k deletiert, alleine oder in Kombination mit der p53-stabilisierenden Mutation E1B-55k R239A (siehe Materialien & Methoden für Details). Nun haben wir gefragt: Können wir mit einer solchen Doppelmutante Ad Δ E1B-19k.E1B-55k R239A eine verstärkte Apoptose beobachten? Die Ergebnisse in Gegenwart von endogenem p53 sind in Abb. 10 gezeigt. In Abwesenheit von E1B-19k in den infizierten Zellen läßt sich nach 48h Apoptose beobachten, hier gezeigt anhand der einsetzenden PARP-Spaltung (Abb. 10A, Spur 4). Dieser Effekt tritt nicht auf in Gegenwart von E1B-19k (Abb. 10A, Spur 2 und Spur 3) sowie in uninfizierten Zellen (Abb. 10A, Spur 1). Interessanterweise ist die in den doppelt mutanten Ad E1B-55k R239A. Δ E1B-19k-infizierten Zellen zu beobachtende Apoptose stärker als in Anwesenheit von wt-E1B-55k (Abb. 10A, vgl. Spur 5 und Spur 4).

Von den N-terminalen alternativen Verkürzungsprodukten p73 Δ N α und p73 Δ N β ist beschrieben worden, daß sie als Kompetitoren für die DNA-Bindung an die p53-Erkennungssequenzen wirken (Yang et al., 1998, Fillippovich 2001, Stiewe et al., 2002). Sie können somit selektiv die transkriptionelle Aktivität von p53 antagonisieren (Grob et al., 2001, Kartasheva et al., 2002), während sie andererseits nicht direkt mit dem p53 Molekül interagieren (Davison et al., 1999). Man kann also durch die Überexpression von Δ N-Varianten des p73 - diese sind selber nicht transkriptionell aktiv - unterscheiden, ob die Effekte auf eine

transkriptionelle Induktion von p53-Zielgenen zurückzuführen sind oder ob sind unabhängig von p53-vermittelter Transkription stattfinden. In Abb. 10B und Abb. 10C ist die einsetzende Apoptose in Gegenwart von überexprimiertem p73 $\Delta N\beta$ und p73 $\Delta N\alpha$ gezeigt. Wiederum tritt Apoptose nur in den Zellen auf, die mit einem E1B-19k-defizienten Virus infiziert wurden (Abb. 10B und Abb. 10C, Spuren 4 und 5). Man erkennt deutlich: Die Apoptose ist jeweils stärker in denjenigen Zellen, die mit der Doppelmutante infiziert wurden (Abb. 10, vgl. Spur 4 mit Spur 5). Da die Apoptose aber auch in Gegenwart des Kompetitors p73 ΔN zu beobachten ist, scheint es sich um eine Art von Apoptose zu handeln, die unabhängig von der transkriptionellen Aktivität von p53 ausgelöst werden kann. Auf der anderen Seite ist die Apoptose abhängig von p53, da sie in der Mutante mit dem Arginin 239 nach Alanin-Austausch deutlich stärker auftritt als in Anwesenheit von wt-E1B-55k, welches direkt an p53 bindet.

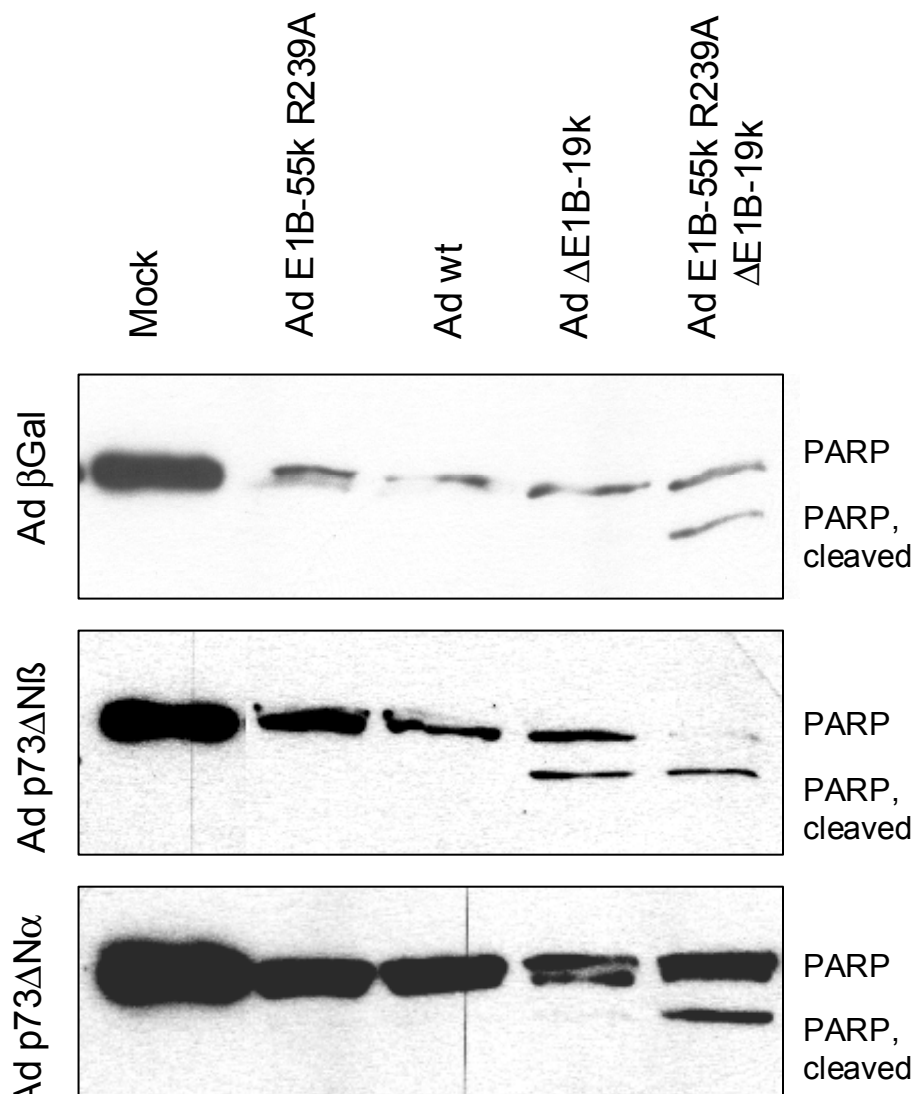


Abb. 10. In Abwesenheit von E1B-19k und in Anwesenheit von p53 zeigen die adenovirusinfizierten Zellen Apoptose. p73 Δ N kann die p53-vermittelte Apoptose nicht verhindern. (A) A549 Zellen wurden uninifiziert gelassen (Mock) oder mit den Adenoviren Ad E1B-55k R239A, Ad wt, Ad Δ E1B-19k oder der Doppelmutante Ad E1B-55k R239A. Δ E1B-19k infiziert (m.o.i. = 10). 48 h p.i. wurden die Zellen in RIPA / 8 M Harnstoff / 6 x Lämmli (2:2:1 v/v) geerntet und auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Western blot wurde gegen PARP gefärbt. **(B)** Zellen wie in (A) wurden zusätzlich mit einem Expressionsvektor für p73 Δ N β , Ad p73 Δ N β (m.o.i. = 60), transduziert. Weiterbehandlung wie in (A). **(C)** Zellen wie in (B) wurden mit einem Expressionsvektor für p73 Δ N α , Ad p73 Δ N α (m.o.i. = 60) transduziert.

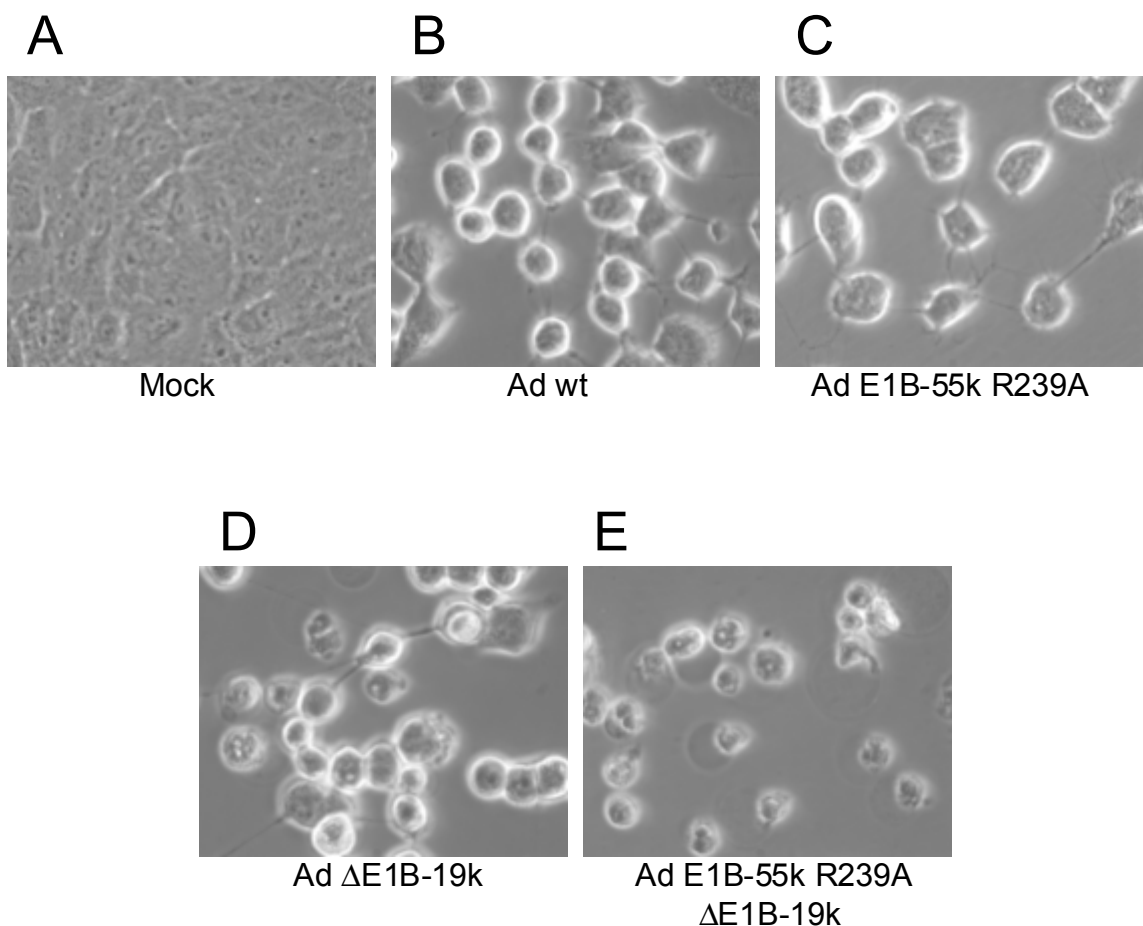


Abb. 11. Bei Fehlen des adenoviralen Proteins E1B-19k beobachtet man Apoptose. Diese Apoptose wird verstärkt bei Akkumulation von endogenem p53, ermöglicht durch die R239A Mutation in E1B-55k. (A) A549 Zellen wurden bei einer m.o.i von 10 mit den verschiedenen Viren infiziert, die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden 48 h p.i. **(B)** LS174T Zellen wurden mit den angegebenen Viren infiziert (m.o.i. = 20) und gleichzeitig für 3h mit 287 nM Camptothecin stimuliert. Die Aufnahmen entstanden 26h p.i.

In Abb. 11 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der virusinfizierten Zellen gezeigt. Sie vermitteln den Eindruck, daß, gegenüber nicht-infizierten Zellen, bereits die Infektion mit wt-Adenovirus zu einem gewissen Verdicken und Abkugeln der virusinfizierten Zellen führt (Abb. 11, vgl. Bild B mit Bild A). Ähnliches gilt, wenn auch zeitlich etwas verlangsamt, für die Ad E1B-55k R239A-infizierten Zellen (Abb. 11, Bild C). Auch in den Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen haften die meisten der abgekugelten Zellen noch an der Kulturschale, doch gibt es auch bereits erste apoptotisch schwimmende (Abb. 11, Bild D). In den Zellen, die mit der Doppelmutante Ad Δ E1B-19k.E1B-55k R239A infiziert wurden, scheint die Apoptose gegenüber den Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen nochmals verstärkt. Eine Mehrzahl schwimmt und zeigt deutliche apoptotische Anzeichen wie nuclear blebbing (Abb. 11 Bild E.) Offenbar ist die vermehrte Apoptose auf die Akkumulation des endogenen p53 zurückzuführen, und das, obwohl p53 transkriptionell nicht aktiv ist.

5.11. Die Deletion der p400-Bindung aus der Primärsequenz von E1A führt zu einer weitestgehenden Wiederherstellung der transkriptionellen Aktivität von p53 in *in vitro* Reporter-Gen-Assays.

Nach den Ergebnissen aus Abschnitt 5.4. war das E1A Protein an der transkriptionellen Inaktivierung des p53 beteiligt. Allein durch eine Elimination der p300-Bindung mittels der Mutante E1A R2G konnte die transkriptionelle Induktion der p53-Zielgene nicht wieder hergestellt werden. Erneut stellte sich die Frage, ob alleine durch die Punktmutation von Arginin 2 nach Glycin die Bindung des E1A an p300 wirklich komplett aufgehoben worden ist, oder aber ob nicht doch eine Restbindeaktivität verbleibt. Wiederum beruht die Aussage E1A binde nicht mehr an p300 auf der Unmöglichkeit, p300 in Gegenwart der R2G-Mutante kopräzipitieren (Wang et al., 1993). Funktionelle Analysen mit dieser Punktmutante hinsichtlich ihres Einflusses auf die transkriptionelle Aktivität von p53 haben erst wir angestellt. Andererseits ist bekannt, daß die Transkription von p53-Zielgenen in Gegenwart eines Überschusses von p300 massiv gesteigert werden kann (Lill et al., 1997b, Gu et al., 1997, Scolnick et al., 1997, Avantaggiati et al., 1997).

Um wirklich ausschließen zu können, daß die p300-Bindung des E1A keinen nennenswerten Beitrag zur Wiederherstellung der transkriptionellen Aktivität von p53 leistet, haben wir weitere Mutanten von E1A getestet, die ebenfalls nicht mehr an p300 binden können (Wang et al., 1993, Whyte et al., 1988, Whyte et al., 1989, Somasundaram et al., 1997). Abb. 13 zeigt die Ergebnisse eines *in vitro* Reporterassays. Zu dem bereits beschriebenen Luziferasekonstrukt unter Kontrolle des p53-abhängigen Mdm2-Promotors haben wir zusätzlich zu p53 noch wt-E1A bzw. die in der Abbildung angedeuteten Mutanten von E1A transfiziert. Man erkennt, daß gerade größere Mengen E1A zu einer deutlichen Reduktion der transkriptionellen Aktivität von p53 führen (Abb. 13, vgl. Spur 2 und Spur 3). Zwar wird durch die E1A-Mutante R2G die inhibitorische Wirkung von E1A auf die Induktion der p53-Zielgene etwas reduziert (Abb. 13, vgl. Spur 4 und Spur 3, siehe auch Abb. 6A Spur 2, 4 und 6), doch gerade bei höheren E1A-Konzentrationen überwiegt auch in der Punktmutante der inhibitorische Effekt. Mit den neu synthetisierten E1A-Mutanten, eine Deletionsmutante der Aminosäuren 15 bis 25 und eine Substitutionsmutante der Aminosäuren 19, 20, 22 und 23 - beide können ebenfalls nicht mehr an p300 binden - erhält man identische Ergebnisse wie zuvor mit der einfachen Substitutionsmutante R2G (Abb. 13, Spur 5 und Spur 6). Zwar zeigen beide analog

R2G (Abb. 13 Spur 4) eine gewisse Verminderung der inhibitorischen Wirkung von wt-E1A (Abb. 13, Spur 3) doch sind die Ergebnisse - gerade bei höheren E1A-Konzentrationen - noch weit entfernt von dem Zustand in Abwesenheit von E1A (Abb. 13, Spur 2). Anhand der Vielzahl an unabhängigen p300-defizienten Mutanten des E1A Proteins schließen wir, daß die Inaktivierung von p300 durch E1A doch nur einen geringen Beitrag zu der transkriptionellen Verstummung von p53 liefert.

In jüngerer Zeit ist beschrieben worden, daß E1A neben p300 noch an eine weitere Histonacetyltransferase, p400, bindet (Lill et al., 1997a, Fuchs et al., 2001, Barbeau et al., 1994). Die Bindungsstelle des p400 auf der Primärsequenz von E1A ist kartiert worden (Fuchs et al., 2001, Deleu et al., 2001). Wir haben nun untersucht, ob die E1A-vermittelte Inaktivierung von p400 für die transkriptionelle Stille der p53-Zielgene verantwortlich sein kann. Abb. 13, Spur 7 zeigt die Ergebnisse der Kotransfektionsversuche mit dem Reporter-genkonstrukt. Im Vergleich zu der Situation ohne E1A ist die transkriptionelle Aktivität von p53 in Gegenwart der E1A-Deletionsmutante 25-36 nur unwesentlich beeinträchtigt. Die zusätzliche Deletion der p300-Bindung in der E1A-Mutante Δ 2-36 zeigt nur noch eine unwesentliche Verbesserung gegenüber der Situation, wo nur die p400-Bindung aus dem E1A Molekül deletiert wurde. Durch die Deletion der p400-Bindungsstelle aus der Primärsequenz von E1A konnte die inhibitorische Wirkung von wt-E1A auf die transkriptionelle Aktivität von p53 aufgehoben werden.

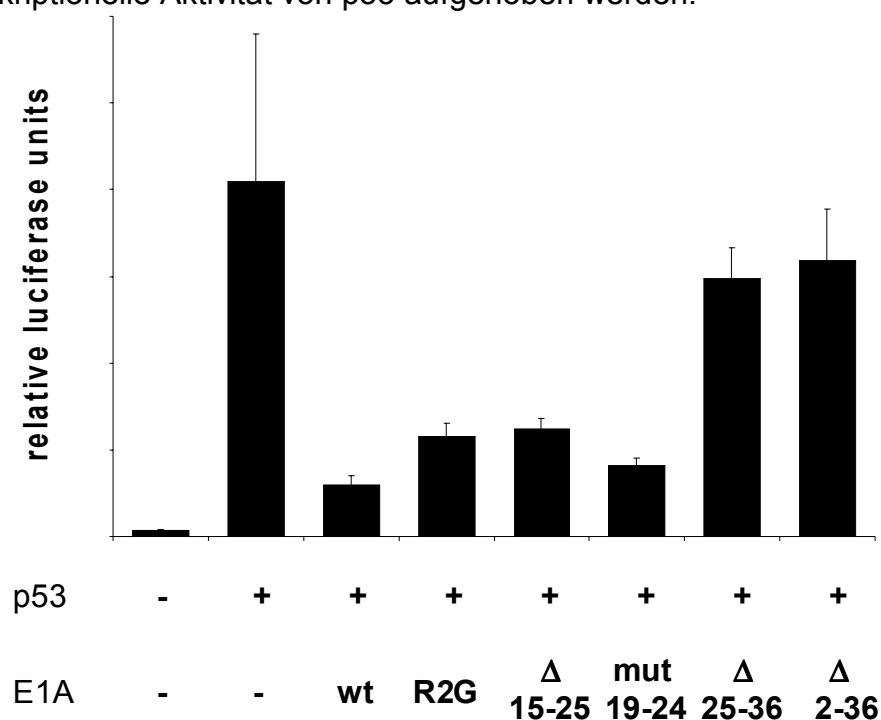


Abb. 13. Eine E1A Mutante, unfähig an p400 zu binden, behindert die transkriptionelle Aktivität von p53 nicht mehr. 130.000 H1299 Zellen wurden in 12 well Platten ausgesäht und mittels Lipofectamin 2000 mit insgesamt 1,2 µg DNA transfiziert. Neben den entsprechenden βGal exprimierenden Füllplasmiden wurden in Spur 1 zusätzlich ausschließlich 50ng des Reporterplasmids pGl3-BP100Luc sowie 50 ng pCMV.NeoBam.egfp transfiziert, in allen weiteren Spuren darüber hinaus auch noch 5 ng pCp53. Ab Spur 3 wurde jeweils noch 1100 ng eines Expressionsplasmids für wt-E1A.13S (pcDNA.3-E1A) oder die jeweils angegebenen, hiervon abgeleiteten Mutanten zugegeben - wie unter der Abbildung angedeutet. E1A R2G, Δ15-25, L19S.L20N.L23S.I24A, und Δ2-36 haben jeweils die p300-Bindung verloren, an die E1A-wt und E1AΔ25-36 noch binden, wohingegen die Mutanten E1AΔ25-36 und E1AΔ2-36 beide die p400-Bindestelle verloren haben, so wie in der Abbildung angedeutet. 24 h p.t. wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Als nächstes haben wir versucht, die in unserem Reporter-genversuch gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation infizierter Zellen zu übertragen. Wir haben hierzu zu den bereits eingeführten Viren Ad ΔE1B-19k.E1B-55k R239A und Ad E1B-55k R239A jeweils Schwesterviren konstruiert, denen durch die

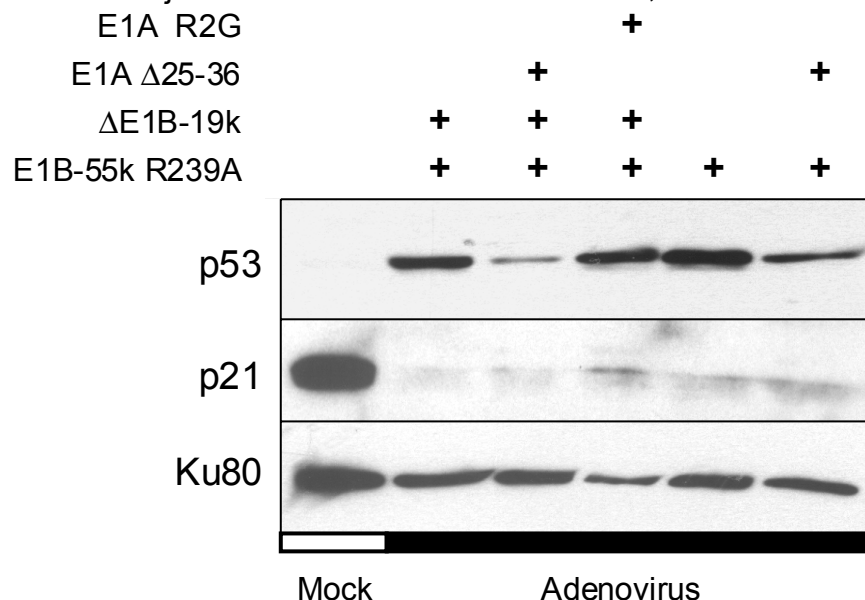


Abb. 14. Im Kontext einer produktiven Adenovirusinfektion führt das zusätzliche Fehlen der p400 Inaktivierung durch ein mutiertes E1A immer noch nicht zu einer Wiederherstellung der transkriptionellen Induktion der p53 Zielgene. A549 Zellen wurden bei einer m.o.i von 15 mit den folgenden mutanten Viren infiziert: Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k (Spur 2), bzw. den hier-von abgeleiteten Schwesterviren Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k.E1AΔ25-36 (keine p400-Bindung, Spur 3) bzw. Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k E1A.R2G (keine p300-Bindung, Spur 4) oder Ad E1B-55k R239A (keine p53-Destabilisierung aber Apoptose-resistent da E1B-19k-positiv, Spur 5) und dem Derivat Ad E1B-55k R239A.E1AΔ25-36 (zusätzlich keine p400-Inaktivierung, Spur 6). Die infizierten Zellen wurden 36 h p.i. in RIPA geerntet und die Lysate im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Abklatschhybridisierung dieses Gels wurde mit Antikörpern gegen p53, p21 und einer Ladekontrolle (Ku80) dekoriert und mit peroxidasegekoppelten spezies-spezifischen Sekundärantikörpern nachgewiesen (WestDura Luminol/Enhancer System, Fa. Pierce).

zusätzliche Deletion der Aminosäuren 25-36 des E1A Proteins die Fähigkeit abhanden gekommen ist, p400 zu blockieren. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse, die man mit den Lysaten von Zellen, die mit solchen Viren infiziert wurden, erhält. Nach wie vor akkumuliert p53 massiv in den infizierten Zellen im Vergleich zu den uninfizierten Zellen (Abb. 14, vgl. Spur 3 und Spur 6 mit Spur 1). Andererseits ist die Akkumulation des endogenen p53 in Abwesenheit einer p400-Inaktivierung durch E1A deutlich weniger ausgeprägt ist als in den Zellen, die entweder ein wt-E1A (Abb. 14, Spur 2 und Spur 5) bzw. eine E1A-Mutante, die nicht mehr an p300 binden kann, enthalten (Abb. 14, Spur 4 und Abb. 6B). Anhand der Induktion des zellulären p21 Gens soll wieder die transkriptionelle Aktivität von p53 gemessen werden, wie dies in der mittleren Bildhälfte gezeigt ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Kotransfektionsversuchen kann in den infizierten Zellen, also in Gegenwart auch aller anderen viralen Proteine, keine Rekonstitution der transkriptionellen Aktivität von p53 bei Entfernen der p400-Inaktivierung beobachtet werden. Im Konzert mit den weiteren viralen Proteinen, wie dies für produktiv infizierte Zellen gilt, ist neben der Aufhebung der p53-Bindung durch E1B-55k auch das zusätzliche Entfernen der p400-

Inaktivierung durch E1A noch nicht ausreichend, um die Induktion der p53-Zielgene durch das akkumulierende endogene p53 wiederherzustellen.

5.12. Trotz vermehrter Apoptose in den Ad Δ E1B-19k.E1B-55k R239A infizierten Zellen führt dies nicht zu einer Verminderung der Virusaussbeute.

In Abb. 11 bzw. Abb. 10 hatten wir die vermehrte Apoptose in den Ad Δ E1B-19k.E1B-55k R239A-infizierten Zellen gezeigt. Dies führte zur Hypothese, daß dies auch zu einer Verminderung des Viruswachstums für die Doppelmutante führt, und zwar in Abhängigkeit von dem p53-Status der Zellen. Um dies zu testen, wurden LS174T Zellen, in Ab- bzw. Anwesenheit von Camptothecin, mit den vier in Abb. 12 gezeigten Viren infiziert (Ad-wt (weiße Balken), Ad E1B-55k R239A (dunkelgraue Balken), Ad Δ E1B-19k (hellgraue Balken) und Ad E1B-55k R239A. Δ E1B-19k (schwarze Balken)). Die Lysate 48 h p.i. wurden dann auf H1299 Zellen getitert und die Virusaussbeute als fluorescence forming units bestimmt. Man erkennt, daß selbst eine Stimulation des p53 nicht ausreicht, um mehr als nur geringfügige Wachstumsunterschiede zwischen den einzelnen Viren hervorzurufen (Abb. 12). Interessanterweise ist in diesem Ansatz ein leichter Abfall der Replikationseffizienz zwischen wt-Virus und der Einfachmutante Ad Δ E1B-19k feststellbar. Hingegen hat die zusätzliche Mutation von E1B-55k in der Doppelmutante keinen detektierbaren verstärkenden Effekt auf die Verminderung der Virusaussbeute. Ähnliches wird auch in primären, p53 positiven Zellen gefunden (Abb. 12, MRC-5 und HFF-Noah). Im Gegensatz hierzu sollte in Abwesenheit von p53 (H1299 Zellen) oder mit mutiertem p53 (C33A Zellen)

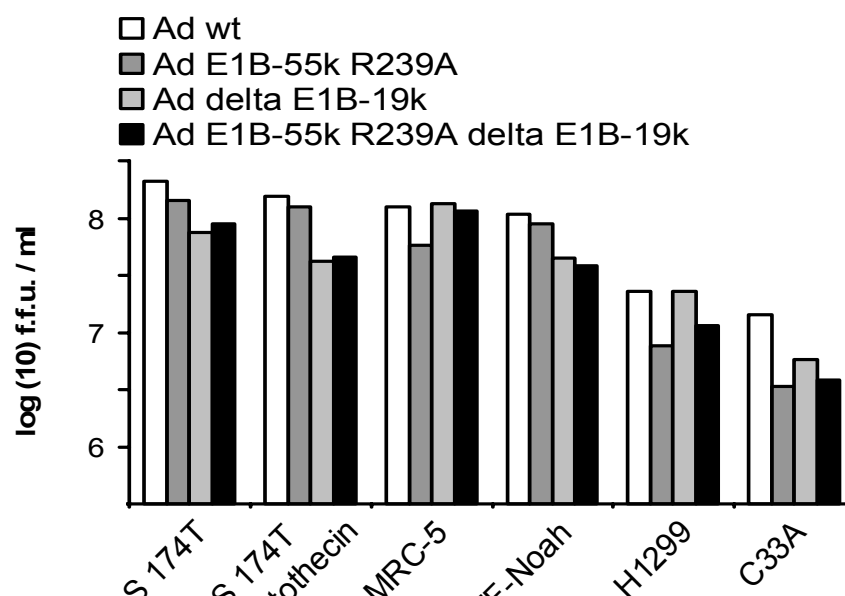


Abb. 12. Trotz vermehrter Apoptose in den Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k infizierten Zellen beobachtet man keine negativen Auswirkungen auf die Virusreplikation. LS174T Zellen wurden mit Ad wt (weiße Balken), Ad E1B-55k R239A (dunkelgraue Balken), Ad ΔE1B-19k (hellgraue Balken) oder Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k (schwarze Balken) mit einer m.o.i. von 10 infiziert und zwar entweder in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von 287 nM der p53 stimulierenden Substanz Camptothecin. 48 h p.i. wurden Zellen und Überstand geerntet und die Zellen durch Einfrieren und Auftauen aufgeschossen. Je 30.000 H1299 Zellen wurden mit absteigenden 1:5 Verdünnungen der Zelllysate infiziert. 20 h p.i. wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,2% Triton X-100 lysiert. Das frühe virale Genprodukt E2A wurde mit B6-8 Hybridomaüberständen und einem AlexaFluor 596-gekoppelten Ziege-α-Maus IgG gefärbt. Die Zellkerne wurden durch Interkalation von 4,6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 100 ng/ml) gegengefärbt. In einem unvereinommenen Studententest wurde nun bei den verschiedenen Verdünnungsstufen der einzelnen Viruslysate für jede Situation (Virustyp, Zeitpunkt, Substanzzugabe) das Verhältnis von roten Kernen (infizierte Zellen) und blauen Kernen (Gesamtzahl Zellen) bestimmt. Der für die einzelnen Verdünnungsstufen erhaltene Prozentsatz wurde geglättet und anhand der Verdünnungsstufe in eine (hypothetische) Gesamtzahl Viren pro 6 well umgerechnet. Das Balkendiagramm zeigt für die einzelnen Situationen den dekadischen Logarithmus dieser Gesamtzahl Viren pro 6 well für ein repräsentatives Experiment. Weitere p53^(+/+) Zellen (MRC-5, HFF-Noah), p53^(-/-) Zellen (H1299) oder p53^{mutR273C} Zellen (C33A) wurden mit Ad wt (weiße Balken), Ad E1B-55k R239A (dunkelgraue Balken), Ad ΔE1B-19k (hellgraue Balken) oder Ad E1B-55k R239A.ΔE1B-19k (schwarze Balken) mit einer m.o.i. von 10, 20, 1, 1 infiziert. Die Virustiter aus den Zell-lysaten - für alle Zellsorten 48 h p.i. – wurde wie beschrieben bestimmt.

der Wachstumsunterschied nicht auftreten, doch wird auch hier, in Abhängigkeit von dem Fehlen des anti-apoptischen E1B-19k Proteins, eine leichte Verschlechterung der Virusaussaat detektiert (Abb. 12). Die in Abwesenheit von E1B-19k für p53^(+/+), Ad E1B-55k R239A-infizierte Zellen beobachtete Apoptose

schlägt sich somit nicht in einer deutlichen Verminderung der Virusausschüttung nieder.

5.13. Auch in Gegenwart einer nicht abbaubaren Variante des p53 läßt sich kein Einfluß des überexprimierten p53 Proteins auf die Virusreplikation feststellen.

Bisher basierten unsere Versuche darauf, daß das endogene p53 in Gegenwart einer bestimmten E1B-Punktmutante in den infizierten Zellen akkumulierte. Wir hatten gesehen, daß zum Auslösen der Apoptose in den infizierten Zellen eine weitere Deletion nötig war, die des überlappenden Leserahmens E1B-19k. Kombinierte man beide Mutationen, die 55k-Punktmutation und die 19k-Deletion, so konnte in der Doppelmutante, also in Abhängigkeit von p53, die Apoptose selektiv stärker beobachtet werden als in den jeweiligen Einzelmутanten. Trotz dieser einsetzenden Apoptose - die mit der Doppelmutante infizierten Zellen sahen im Lichtmikroskop ja bereits massiv geschädigt aus (vgl. Abb. 11) - konnten wir keinen wirklich merklichen Effekt auf die Virusreplikation feststellen (vgl. Abb. 12). Möglicherweise waren die sich ansammelnden p53-Mengen einfach noch nicht ausreichend, um die Virusreplikation deutlicher zu inhibieren. Daher haben wir uns entschlossen, p53 mit Hilfe eines adenoviralen Erstgenerationsvektors überzuexprimieren.

wt-p53 wird von Adenoviren bekanntlich abgebaut (Querido et al., 1997, Steegenga et al., 1998). Dies gilt jedoch nicht für p73, einen engen Verwandten des p53 (Roth et al., 1998, Marin et al., 1998). Wir hatten bereits an anderer Stelle eine Chimäre des p53 beschrieben, bei der die Aminosäuren 24-28 durch die entsprechende homologe Sequenz des p73 ersetzt worden war (Roth et al., 1998). Hierdurch wurde eine E1B-resistente Variante von p53, p53mt24-28, generiert. Diese nicht abbaubare Variante von p53 haben wir nun eingesetzt, um den Einfluß von p53 auf die Adenovirusinfektion zu klären. Insbesondere wollten wir hierbei den Beitrag von E1B-19k klären, dem antiapoptotischen Protein, welches die negativen Konsequenzen der p53-Akkumulation wirksam zu unterbinden vermag.

In Abb. 15 ist ein Vorversuch gezeigt. Er zeigt, daß die p53-Zielgene p21, Mdm-2 und bax im Rahmen einer Adenovirusinfektion durchaus in ihrer Expression stimuliert werden können, und zwar dann, wenn man dieses chimäre p53mt24-28 einsetzt. Es spielt hierbei interessanterweise keine Rolle, ob die Zellen uninfiziert, mit Ad-wt oder mit Ad Δ E1B-19k infiziert wurden (Abb. 15, vgl. Spur 7, 8 und 9). In Gegenwart des parallel überexprimierten Kontrollproteins β -Galactosidase ('Ad lacZ'-transduzierte Zellen) kann man in diesem Versuch deshalb keinen Unterschied in den p21-, Mdm-2- und bax-Mengen beobachten (Abb. 15, vgl. Spur 4, 5 und 6), weil für diesen Versuch eine p53^(-/-)-Zelllinie verwendet wurde.

Betrachtet man nun die in Abb. 15 beschriebenen Koinfektionen im Lichtmikroskop, so ergibt sich das folgende, in Abb. 16 gezeigte Bild. Die Ergebnisse in Gegenwart des β -Galactosidase überexprimierenden Vektors sind stets identisch mit denjenigen, wo überhaupt kein weiteres Virus zugegeben wurde (bezeichnet mit 'Mock'). Adenovirusinfizierte Zellen, 48 Stunden nach Infektion, sehen stets so aus, wie es in Abb. 16 in den beiden oberen Spalten gezeigt ist. Sie sind zwar dicker geworden (Zytomegalie), haben sich zusammengezogen bzw. weit überwiegend auch schon abgerundet (bedingt durch eine Restrukturierung des Cytoskeletts (Staufenbiel et al., 1986)), sie haften aber nach wie vor an der Zellkulturschale. Es spielt hierbei auch keine Rolle, ob die Zellen mit Ad-wt oder mit Ad Δ E1B-19k (Ad d/337) infiziert wurden (siehe Abb. 16), obwohl in der Literatur anderes beschrieben worden ist (White et al., 1984, Pilder et al., 1984) (Der Unterschied zwischen unseren Versuchen und denjenigen aus dem Literaturzitat besteht darin, daß wir eine p53 negative Zelllinie, H1299 Zellen, verwendet haben).

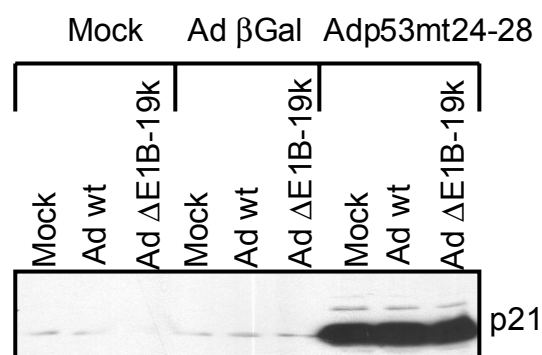


Abb. 15. Das E1B-resistente chimäre p53 Molekül p53mt24-28 ist in virus-infizierten Zellen transkriptionell aktiv und verursacht dort in Abwesenheit von E1B-19k Apoptose. H1299 Zellen wurden uninferiert gelassen oder mit wt-Adenovirus (Ad *d/309*) bzw. einer E1B-19k defizienten Virusmutante (Ad *d/337*) infiziert (m.o.i = 5) (Spuren 1-3). In parallelen Ansätzen wurden die Zellen zusätzlich mit viralen Erstgenerationsvektoren für β Gal (Spuren 4, 5 und 6) bzw. der nicht abbaubaren p53 Variante p53mt24-28 transduziert (Spuren 7-9), jeweils mit einer m.o.i = 30. 30 h nach Infektion wurden die Zellen in RIPA geerntet und die Proteine im denaturierenden SDS-Gel getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde nacheinander mit Antikörpern gegen p21, Mdm-2 und bax dekoriert.

Ganz anders sieht das Bild jedoch aus, wenn wir die Morphologie der Zellen betrachten, die mit einem das chimäre p53mt24-28 überexpimierenden Vektor transduziert wurden. p53mt24-28 alleine erzeugt bereits merkliche Ansätze von Apoptose in den transduzierten Zellen (Abb. 16, links unterste Zeile). Zellen, die mit Ad-wt überinfiziert wurden, zeigen keinesfalls diese auf den einsetzenden Zelltod hindeutenden morphologischen Verformungen. Sie sehen aus wie normale infizierte Zellen. Offenbar kann also das Adenovirus die durch p53mt24-28 ausgelöste Apoptose aufhalten. Ein geradezu dramatisch anderes Bild ergibt sich für die Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen in Gegenwart von nicht abbaubarem p53mt24-28. Alle Zellen haben sich von der Zellkulturschale abgelöst und schwimmen frei umher. Die Zellen haben sich weitestgehend aufgelöst und aus den Zellkernen bilden sich blasenförmige Ausstülpungen ('nuclear blebbing'), wie sie für eine fortgeschrittenen Apoptose charakteristisch



Abb. 16. Der Zelltod, begleitet von Ablösen und blasenförmigen Ausstülpungen aus dem Zellkern, wird nur für die Kombination aus Ad Δ E1B-19k und Ad p53mt24-28 beobachtet. Das Infektionsschema ist identisch dem Ansatz in Abb.15, doch wurde m.o.i. = 6 und m.o.i. = 60 für replizierende (nicht-replizierende) Viren gewählt. Zu verschiedenen Zeitpunkten - gezeigt sind die Bilder für 48 h p.i. - wurden die H1299 Zellen im Lichtmikroskop analysiert. Die jeweiligen Kombinationen aus replizierendem Virus und Überexpressionsvektor ergeben sich aus der spalten- und zeilenweisen Kombination der nebenstehenden Beschriftungen.

sind (Robertson et al., 1978). Da dieser Effekt in Abwesenheit von p53mt24-28 nicht zu beobachten war (Abb. 16, Spur 3, mittlere Zeile), andererseits aber bei Anwesenheit von p53mt24-28 und E1B-19k ebenfalls nicht zu beobachten ist (Abb. 16, Spur 2, unterste Zeile), geht er klar auf die ungehemmte Wirkung von p53 in Abwesenheit von E1B-19k zurück.

Um zu verifizieren, daß das, was wir lichtmikroskopisch beobachtet hatten, tatsächlich Anzeichen von Apoptose waren, haben wir die Zellen lysiert und gegen PARP gefärbt. Das charakteristische 85 kDa große Spaltfragment von Poly(ADP-Ribose)Polymerase, einem Substrat der ausführenden Caspase-3 (Tewari et al., 1995) kann, trotz vergleichbarer Mengen an p53mt24-28, nur in den Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 17).

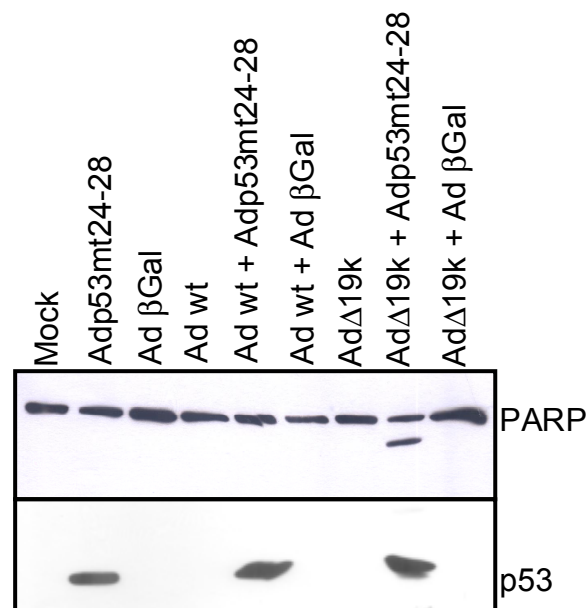


Abb. 17. Apoptose (PARP-Spaltung) wird - in Abhängigkeit von p53 - nur in den Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen beobachtet. Abb.17 ist erneut ein identischer Ansatz zu Abb.15. 24 h p.i. wurden die infizierten und transduzierten H1299 Zellen in RIPA / 8 M Harnstoff / 6 x Lämmli 2:2:1 (v/v)) geerntet, der Größe nach aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion wurden spezifische Antikörper gegen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) oder das Tumorsuppressorprotein p53 verwendet.

5.14. Trotz massiver Apoptose in den p53mt24-28-exprimierenden und Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen stellt sich keine Benachteiligung im Viruswachstum ein.

In den Zellen, die sowohl mit der nicht abbaubaren Variante von p53, p53mt24-28, und dem E1B-19k-defizienten Adenovirus infiziert worden waren, hatten wir eine massive Apoptose beobachtet (Abb. 16). Man würde also annehmen, daß

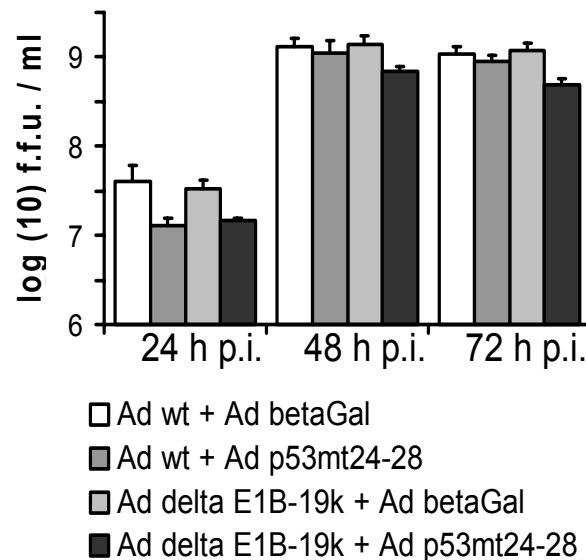


Abb. 18. Die massive Apoptose bei Abwesenheit des anti-apoptotischen E1B-19k Proteins hat in den infizierten, p53mt24-28-überexprimierenden Zellen keinen nennenswerten Einfluß auf die Virusausschüttung. H1299 Zellen wurden mit einer m.o.i. von 4 entweder mit wt-Adenovirus (Ad *d/309*) oder einem E1B-19k-defizienten Adenovirus (Ad *d/337*) infiziert. Gleichzeitig wurden sie transduziert mit einem replikationsinkompetenten, β Gal- bzw. p53mt24-28-überexprimierenden Virus (m.o.i = 50). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die infizierten Zellen in ihren Überständen durch Einfrieren und Auftauen lysiert. Diese Lysate wurden in 1:5 Schritten verdünnt und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf H1299 Zellen in 8 well Objektträgern (Labtek) gegeben. 20 h nach Infektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und gegen das virale DNA-bindende Protein E2A immungefärbt. Aus dem Verhältnis der roten (E2A-positiven, fluorescein-markierten) Kernen zu blauen Kernen (DAPI-Färbung aller - auch nicht infizierter - Kerne) konnte im unvoreingenommenen Studententest der Gehalt an infektiösen Partikeln in der ursprünglichen Probe ermittelt werden. Pro Situation wurden die Werte aus 4 zu berücksichtigenden Konzentrationsstufen geglättet und zu einem Wert verdichtet. Dieser sogenannte Wert wurde in mehreren unabhängigen Experimenten jeweils in 3-fach Bestimmung ermittelt. Gezeigt ist der dekadische Logarithmus einer solchen Wertegruppe.

in diesen apoptotischen Zellen das Viruswachstum der Mutante, nicht aber des wt-Adenovirus, stark beeinträchtigt ist. Um dies näher zu untersuchen haben wir Zellen mit entweder einem Kontrollprotein oder p53mt24-28 unter Kontrolle eines CMV-Promotors transduziert. Diese Zellen wurden gleichzeitig infiziert mit

replikationskompetenten Adenoviren, entweder Ad-wt oder Ad Δ E1B-19k. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und der Virustiter der Lysate als fluorescence forming units auf H1299 Zellen bestimmt (siehe Materialien & Methoden für Details). Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt. Überraschenderweise ergibt sich kein nennenswerter Rückgang der Virusausbeute für die Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen in Gegenwart von E1B-resistentem p53 (schwarze Balken). Die erhaltenen Virustiter liegen nicht nennenswert unter denjenigen für das E1B-19k-lose Virus in Gegenwart eines Kontrollproteins (hellgraue Balken) oder das wt-Virus in Gegenwart (dunkelgrau) oder Abwesenheit (weiß) von p53mt24-28.

Als nächstes haben wir die verschiedenen Phasen der Virusreplikation genauer untersucht, um feststellen zu können, ob es - angesichts der beobachteten Apoptose - nicht doch zu Veränderungen in den frühen oder späten Proteinen kommt. Wie zuvor haben wir untransduzierte, mit einem Kontrollprotein transduzierte oder eine nicht abbaubare Variante von p53 exprimierende Zellen (Ad p53mt24-28) entweder uninfiziert gelassen (Mock), mit Ad-wt (*d*/309) oder aber mit einem E1B-19k-deletierten Adenovirus (Ad *d*/337, genannt Ad Δ E1B-19k) infiziert. Die Ergebnisse zeigt Abb. 19A.

Bei dem in der obersten Zeile gezeigten Protein handelt es sich um E1A, einem typischen frühe Phase Protein, welches in Form von 2 alternativen Spleißprodukten auftritt: E1A-12S (243R) und E1A-13S (289R) (Halbert et al., 1979). Insbesondere die größere Form wird auch in den apoptotischen Ad Δ E1B-19k / Ad p53mt24-28-infizierten Zellen in unverminderter Menge im Vergleich zu den nicht apoptotischen anderen Kombinationen synthetisiert (Abb. 19A, oberste Zeile). Ein ähnliches Bild ergibt sich für E2A. E2A stabilisiert die virale einzelsträngige DNA während der semi-konservativen Replikation des Adenovirusgenoms und ist damit ein typisches mittlere Phase Genprodukt. Auch hier lassen sich keine quantitativen Unterschiede zwischen den infizierten, apoptotischen Zellen (Abb. 19A, rechte äußerste Spalte) und den anderen, infizierten, aber nicht apoptotischen Zellen messen (Abb. 19A, mittlere Zeile, Spalten 1-8). Das Hexonprotein, ein virales Strukturprotein, ist ein typischer Vertreter der

späten Phase Genprodukte, die unter Kontrolle des Adenovirus Major Late Promotors stehen. Obwohl Hexon zahlreiche DEVD-Motive, also Spaltstellen für Caspasen (Hasegawa et al., 1996)), aufweist, gibt es in den Ad p53mt24-28-transduzierten Zellen keine selektive Reduktion der Menge an Hexonprotein

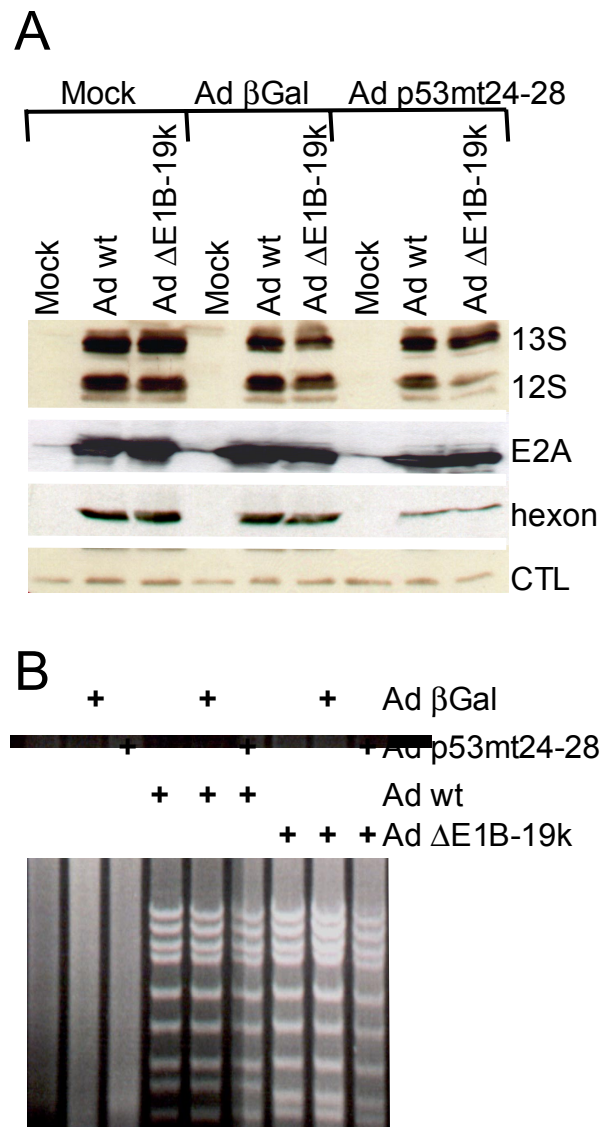


Abb. 19. Trotz massiver Apoptose lässt sich in den virusinfizierten Zellen kein Unterschied in den Mengen an frühen oder späten Proteinen sowie der Effizienz der DNA Replikation feststellen. (A) H1299 Zellen wurden in Ab- bzw. Anwesenheit eines β Gal- bzw. p53mt24-28-überexprimierenden Virusvektors (m.o.i = 60) mit den vermehrungsfähigen Viren Ad *d/309* ('Ad-wt') oder Ad *d/337* ('Ad Δ E1B-19k') infiziert (m.o.i. =6) bzw. uninferiert gelassen ('Mock'). Lysate der in RIPA 30 h p.i. geernteten infizierten Zellen wurden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Diese Membranen wurden mit α E1A-, α E2A- und α hexon-spezifischen Antikörpern

immungefärbt, mit speziespezifischen peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern dekoriert und Luminol/H₂O₂ behandelt. Die mit 'Ladekontrolle' bezeichnete Bande ist eine unspezifische 19-kDa Bande aus einem α Mdm-2-Blot (nicht gezeigt). **(B)** In einem parallelen Ansatz wurde DNA aus den infizierten H1299 Zellen isoliert. 2,5 μ g total DNA wurden mit *Hind* III verdaut. Neben einem Schmier an zellulärer DNA tritt die virale DNA als distinkte Banden hervor. Aufgrund einer 135 bp Deletion im offenen Leserahmen für E1B-19k ist das *Hind* III Fragment H in den Spuren 7,8 und 9 geringfügig kleiner (hervorgehoben durch einen Punkt). Die Kombination aus den verschiedenen Vektortransduktionen (Spur 2 und Spur 3) mit den wt-Viren (Spuren 4,5 und 6) sowie den E1B-19k losen Virusmutanten (Spuren 7-9) sind über der Abb. angedeutet.

im Vergleich zwischen wt- und Δ E1B-19k-infizierten Zellen. Für beide, also Ad wt und Ad Δ E1B-19k, sind die Mengen an Hexonprotein gegenüber den mit β -Galactosidase-transduzierten Zellen reduziert (Abb. 19A, vgl. Spuren 8,9 mit Spuren 5,6).

In Abb. 19B ist die Effizienz der viralen DNA Replikation dargestellt. Auch hier erkennt man keine qualitativen Unterschiede zwischen dem viralen DNA-Gehalt, der aus den apoptotischen E1B-19k-defizienten Viren in Gegenwart des nicht abbaubaren p53 gewonnen wird. Auch die DNA-Replikation läuft also in den morphologisch massiv geschädigten Zellen in nur geringfügig verminderter Weise ab. Ihre Ausbeute ähnelt der aus den anderen, morphologisch nicht beeinträchtigten Ansätzen mit dem wt-Virus oder in Abwesenheit von p53. Auf keiner Stufe der Adenovirusreplikation kommt es zu deutlichen Unterschieden im Replikationszyklus trotz der offensichtlichen morphologischen Schäden. Somit überrascht es nun nicht mehr, daß für die Kombination Ad p53mt24-28 und Ad Δ E1B-55k eine nahezu unverminderte Virusausbeute gefunden wurde.

6. Diskussion

Wir haben ein Virus konstruiert, dessen E1B-55k nicht mehr an p53 zu binden vermag. Als Konsequenz akkumuliert das zelluläre p53 in Zellen, die mit diesem Virus Ad E1B-55k R239A infiziert wurden (Shen et al., 2001). Die Punktmutante von E1B-55k kann nach wie vor einen Komplex mit E4 orf6 und weiteren Komponenten des Ubiquitinligasekomplexes bilden (Shen et al., 2001, Querido et al., 2001, Harada et al., 2002). Dieser aber kann p53 nun nicht mehr für den proteasomalen Abbau markieren. Obgleich p53 nun in den infizierten Zellen akkumulierte, kam es nicht zu der erwarteten Apoptose. Zwei Effekte sind hierfür verantwortlich: Das p53 in den virusinfizierten Zellen ist nicht transkriptionell aktiv. Zusätzlich verhindert ein weiteres adenovirales Protein, E1B-19k, diejenige Apoptose, die unabhängig von einer transkriptionellen Aktivität des p53 ausgelöst wird, möglicherweise durch Translokation des p53 in die Mitochondrien (Marchenko et al., 2000, Regula et al., 2001, Mihara et al., 2003). Beide Antagonismen haben wir näher untersucht.

Nach transienter Transfektion konnten wir keine Inhibition der transkriptionellen Induktion der p53-Zielgene durch das mutante E1B-55k R239A Protein feststellen. Ein weiteres virales Genprodukt mußte also für die p53-Inhibition in produktiv infizierten Zellen verantwortlich sein. Als einen naheliegenden Kandidaten haben wir das E1A Genprodukt untersucht. Von E1A war bekannt, daß es an p300, CBP und PCAF bindet (Howe et al., 1990, Yang et al., 1996, Scolnick et al., 1997). Alle diese drei Proteine sind Histonacetyltransferasen (Ogryzko et al., 1996, Yang et al., 1996, Bannister et al., 1996), die aber zusätzlich auch p53 acetylieren können (Gu et al., 1997, Liu et al., 1999, Ito et al., 2001, Pearson et al., 2000). p53 erfährt hierdurch eine Stabilisierung (Sakaguchi et al., 1998, Li et al., 2002, Luo et al., 2000) und seine Fähigkeit, an DNA zu binden, wird durch die Acetylierung der Lysinreste 382 und 320 deutlich verbessert (Gu et al., 1997, Sakaguchi et al., 1998, Harrod et al., 2003). Gleichzeitig wirkt ein Essigsäurerest, mit einer Lysinseitenkette zu einer Amidfunktion verknüpft, wie eine Schutzgruppe auf der ϵ -Aminofunktion, so daß p53, dort, wo es acetyliert ist, nicht mehr ubiquitinyliert werden kann (Li et al., 2002). Die Acetylierung von

p53 hilft dem p53 also, seine Lebensdauer zu verlängern (Scolnick et al., 1997, Yuan et al., 1999, Li et al., 2002). E1A jedoch verhindert die Acetylierung von p53 (Chakravarti et al., 1999).

In der Tat konnten wir einen inhibitorischen Effekt des E1A auf die transkriptionelle Aktivität von p53 feststellen. In unseren Reportergenversuchen war die Induktion des Luziferasegens in Gegenwart von wt-E1A auf weniger als ein Zehntel zurückgegangen. Mit Hilfe von insgesamt drei verschiedenen Mutanten von E1A, einer Punktmutante, einer Deletionsmutante und einer Substitutionsmutante, haben wir jeweils die p300-Bindestelle aus der Primärsequenz des E1A eliminiert (Stein et al., 1990, Whyte et al., 1989, Wang et al., 1993, Moran et al., 1987). Mit jeder der unterschiedlichen Mutanten war im Vergleich zu wt-E1A eine gewisse Verbesserung der transkriptionellen Induktion der p53-Zielgene bemerkbar. Insgesamt betrachtet überwog aber auch in Gegenwart der drei E1A Mutanten immer noch der Repressionseffekt auf die p53-Transaktivierung. Eine dieser Mutationen, die Punktmutation R2G in den E1A-Genprodukten, haben wir auch in dem Kontext des gesamten viralen Genoms getestet. Doch auch in den Zellen, die mit der Doppelmutante Ad E1B55k R239A.E1A R2G infiziert worden waren, konnten wir keine Wiederherstellung der transkriptionellen Aktivität des endogenen p53 beobachten.

Die jüngere Veröffentlichung aus einer anderen Arbeitsgruppe, E1A binde neben den genannten Proteinen zusätzlich an p400 und TRRAP, legte einen anderen Mechanismus der p53-Inhibition nahe (Fuchs et al., 2001, Deleu et al., 2001, Barbeau et al., 1994). Von p400 war bekannt, daß es ebenfalls eine chromatinmodulierende Funktion besitzt, wird es doch zusammen mit DNA Helicasen in einem als TIP60 bezeichneten Komplex gefunden (Fuchs et al., 2001, Wood et al., 2000). TRRAP hingegen ist ein Bestandteil des PCAF assoziierten Histonacetyltransferasekomplexes und bindet ebenfalls an die Aminosäuren 25-36 von E1A (Fuchs et al., 2001, Vassilev et al., 1998). Gegenwärtig ist nicht klar, ob beide dieser Proteine oder nur TRRAP für die von E1A vermittelte Immortalisation von Zellen mit E1A interagieren müssen (Deleu et al., 2001).

p53 benötigt TRRAP zur Induktion seiner Zielgene (Ard et al., 2002). Solche Histonacetyltransferasen sind wichtige transkriptionelle Ko-Aktivatoren: Sie wirken als Adaptor Proteine, welche die sequenzspezifische DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren - p53 ist nur einer von vielen solcher sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren - weitervermitteln (Espinosa et al., 2001, Brown et al., 2001). Durch das Übertragen von Essigsäureresten auf *N*-terminale Lysine der Histone wird die Interaktion zwischen den Histonen und der DNA gelockert (Brownell et al., 1996). Diese lokalen Änderungen in der Verpackungsstruktur der p53-Zielgene bereiten auf das anschließende Ablesen der Gene durch die RNA-Polymerase II vor. Unterbleibt diese p53-vermittelte Auflockerung der Histonpackung, so kann die p53-abhängige Genaktivierung nicht stattfinden, obwohl p53 nach wie vor an seine Konsensus-DNA-Sequenz bindet (Juan et al., 2000, Murphy et al., 1999).

Es war daher naheliegend zu fragen, ob es nicht einen Weg gäbe, diese Inaktivierung von p400/TRRAP durch E1A aufzuheben. Glücklicherweise war die Bindestelle von p400/TRRAP auf der Primärsequenz von E1A bereits bekannt (Barbeau et al., 1994, Fuchs et al., 2001). Unsere Reportergenversuche mit überexprimiertem E1A Δ 25-36 zeigten, daß die transkriptionelle Induktion der p53-Zielgene durch das E1A Δ 25-36 praktisch nicht mehr beeinträchtigt wurde. Daraufhin haben wir auch das entsprechende Virus konstruiert. Im Kontext einer produktiven Adenovirusreplikation jedoch blieb das p53 - welches aufgrund der E1B-55k-Punktmutation nach wie vor akkumulierte - auch nach Aufhebung der p400-Bindung an E1A transkriptionell inaktiv.

In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, welche weiteren adenoviralen Proteine neben E1B-55k und E1A denn als Antagonisten einer transkriptionellen Induktion der p53-Zielgene auftreten könnten. Ein naheliegender Kandidat ist das E4 orf6 Protein. Von E4 orf6 ist beschrieben, daß es direkt mit p53 interagiert (Dobner et al., 1996). Weiterhin ist von E4 orf6 bereits beschrieben, daß es die Fähigkeit von p53, als Transkriptionsfaktor zu wirken, unterdrücken kann (Dobner et al., 1996, Nevels et al., 1997). Wir haben den Einfluß von E4 orf6 auf die transkriptionelle Induktion eines unter Kontrolle des Mdm2 Promotors

stehenden Luziferasegens ebenfalls untersucht (Abb. 4A, Spur 7). Dort fanden wir eine Verminderung der p53-Aktivität auf nur noch ein Fünftel des Wertes in Abwesenheit von E4 orf6. Im Vergleich zu den anderen diskutierten Antagonisten der transkriptionellen Aktivität von p53 - verbunden mit einer Inhibition um mehrere Logstufen - ist der mit E4 orf6 beobachtete Effekt relativ gering. Gewichtiger noch ist der Umstand, daß sich diese herunterregulierenden Effekte durch E4 orf6 stets nur in Anwesenheit eines großen Überschusses an E4 orf6 beobachten lassen (Steegenga et al., 1999a), so daß diese Gruppe zu dem Schluß kommt E4 orf6 habe keinen (wesentlichen) Einfluß auf die p53-Transaktivierung (Steegenga et al., 1999a). E4 orf6 kommt in den virusinfizierten Zellen nur in ausgesprochen geringen Mengen vor (König et al., 1999, Cutt et al., 1987). Daher glauben wir, daß der Einfluß von E4 orf6 auf die p53-Zielgenexpression in den infizierten Zellen nur von untergeordneter Bedeutung sein müßte.

Letzlich kann nur eine Mutante, in der neben Mutationen in E1A und E1B-55k auch noch E4 orf6 deletiert ist, eine Antwort geben (Bridge et al., 1990). Wir verfügen über solch eine Mutante nicht. Ein weiteres Problem könnte dadurch entstehen, daß E4 orf3 das E4 orf6 funktionell komplementieren kann (Huang et al., 1989, Boyer et al., 1999). Erst in der Doppeldeletion Δ E4 orf6 und Δ E4 orf3 wären die überlappenden Funktionalitäten von E4 orf6 und E4 orf3 tatsächlich ausgeschaltet (Huang et al., 1989, Bridge et al., 1989). Eine solche Mutante wächst nicht, bzw. wächst nur auf einer komplementierenden Zelllinie (Huang et al., 1989, Bridge et al., 1989, Weinberg et al., 1983). Vielleicht gelingt es ja zukünftig, nicht über Deletionen, sondern über die Veränderung einzelner Aminosäurereste die Proteine E4 orf6 und E4 orf3 soweit zu 'entschärfen', daß sie Viruswachstum zwar noch zulassen, p53 aber nicht mehr behindern.

Wenn p53 in den virusinfizierten Zellen nicht transkriptionell aktiv ist, muß es hierfür eine molekulare Ursache geben. Erste Versuche hierzu haben wir unternommen. So wird p53 während einer produktiven Adenovirusinfektion mit der Mutante Ad E1B-55k R239A weder erkennbar relokalisiert (Abb. 9) noch verhindert die Infektion die Phosphorylierung von p53 (Abb. 8). Die *N*-terminalen

Phosphorylierungen stabilisieren p53, weil sie ihm erlauben, sich einer Destabilisierung durch die p53-spezifische E3 Ubiquitinligase Mdm2 zu entziehen (Shieh et al., 1997). Sterische Hinderung durch die Phosphatreste verhindert eine Bindung von Mdm2 an seine überlappende Erkennungssequenz auf der p53 Primärstruktur (Chen et al., 1993, Lin et al., 1994, Kussie et al., 1996). Hierdurch wird phosphoryliertes p53 vor Ubiquitinierung und Abbau geschützt (Shieh et al., 1997, Khanna et al., 1998).

Eine weitere post-translationale Modifikation von p53 ist die Acetylierung seiner C-terminalen Lysinreste. Auch sie stabilisiert p53 und hilft p53 dabei, an DNA zu binden (Li et al., 2002). Noch wichtiger aber ist wohl, daß p53-Acetylierung das Andocken der notwendigen Transkriptions-Ko-Aktivatoren wie TRRAP oder CBP verstärkt (Barlev et al., 2001). Eine interessante Frage wäre also, ob denn die Acetylierung von p53 durch die Adenovirusinfektion gestört wird. Die Acetylierung von p53 wird durch die drei Enzyme p300, p400 und PCAF bewirkt. Die Inaktivierung von p300 und p400 durch E1A hatten wir bereits durch E1A-Mutationen ausgeschaltet. Dennoch reichte dies nicht aus, um die p53-vermittelte Transaktivierung in den virusinfizierten Zellen wiederherzustellen. Doch auch PCAF wird von E1A gebunden (Yang et al., 1996, Reid et al., 1998). Lysin 320 von p53 befindet sich in der flexiblen Linkerregion zwischen DNA-bindender und Oligomerisierungsdomäne (Pavletich et al., 1993) und wird spezifisch von PCAF acetyliert (Sakaguchi et al., 1998). Die Inaktivierung von PCAF durch das Adenovirus läßt sich deutlich schwerer ausschalten: Zum einen überlappt die PCAF-Bindestelle auf E1A (Reid et al., 1998) mit den Aminosäuren die notwendig für die pRb Bindung sind (Fattaey et al., 1993), zum anderen wird PCAF darüber hinaus auch von E1B-55k gebunden und inaktiviert (Liu et al., 2000). Schon früher war beobachtet worden, daß diese extreme C-terminale Domäne von E1B-55k, die hierfür phosphoryliert werden muß, für die transkriptionelle Repression von p53 mit verantwortlich ist, ohne direkt an p53 zu binden (Teodoro et al., 1997). Aufgrund dieser multiplen Interaktionen wird es uns jedoch kaum gelingen, ein replikationsfähiges Virus zu basteln, welches nicht mehr PCAF inhibiert (Chakravarti et al., 1999, Liu et al., 2000).

Allein durch die zusätzlichen E1A-Mutationen, welche die p300- und die p400-Bindung aufheben, konnte die transkriptionelle Aktivität von p53 in den virusinfizierten Zellen nicht wiederhergestellt. Interessanterweise aber beobachten wir in den Δ p400-infizierten Zellen eine deutlich verminderte Akkumulation des zellulären p53 verglichen mit Zellen, die mit den entsprechenden Schwester-viren infiziert worden waren, die noch ein wt-E1A besitzen. Dies könnte mit jüngeren Beobachtungen von Grossman et al. (Grossman et al., 2003) korrelieren. Die Autoren hatten gezeigt, daß die Histonacetyltransferase p300 neben Acetatgruppen auch aktivierte Ubiquitinreste zu übertragen vermag. Nicht nur das, sondern Mdm2 bewirke nur die Monoubiquitinylierung von p53. Die für den proteasomalen Abbau erforderliche Polyubiquitinylierung würde erst durch funktionelles p300 bewirkt (Grossman et al., 2003, Zhu et al. 2001). Postulierte man auch für die Histonacetylase TRRAP eine ähnliche Rolle, so ließe sich so die verminderte Akkumulation von p53 über eine wiedergewonnene Reduzierung der p53-Stabilität erklären.

p53 muß Homotetramere bilden, um als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor die Induktion seiner Zielgene bewirken zu können (Friedman et al., 1993, McLure et al., 1998 Halazonetis et al., 1993). Könnte also Adenovirusinfektion die transkriptionelle Aktivität von p53 auf eine Art und Weise ausschalten, bei der es (neben den bereits bekannten Antagonismen) auch die Homooligomerisierung von p53 verhindert? Ein Sprengen der Homooligomere könnte erklären, warum in Gegenwart mehr als ausreichender Mengen p53 dieses keine Zielgeninduktion mehr zeigt. Bindet das akkumulierende p53 in den virusinfizierten Zellen etwa nicht mehr an DNA? Das bereits erwähnte Lysin 382 liegt in der Oligomerisierungsdomäne von p53. Vielleicht ist die Ladungsneutralisation an diesem Lysin (über die Essigsäure-Schutzgruppe) notwendig, um eine Homo-tetramerisierung von p53 erst zu ermöglichen (Gu et al., 1997, Ito et al., 2001, Chakravarti et al., 1999, Juan et al., 2000 Yakovleva et al., 2001, Wang et al., 2003). Klar ist nämlich auch, daß p53, in Bakterien synthetisiert - aus ungeklärten Gründen - nicht transkriptionell aktiv ist (Meek et al., 1990). Nur p53 isoliert aus Insektenzellen kann auch p53-vermittelte Gentranskription ermöglichen (O'Reilly et al., 1988, Delphin et al., 1994, Weissker et al., 1992). Vieles deutet also auf eine - unbekannte -

posttranslationale Modifikation. Doch auch eine Störung der cis-trans-Isomerisierung von p53 in seiner Polyprolinregion wäre eine weitere Möglichkeit, die sowohl in Bakterien als auch in adenovirusinfizierten Zellen ausbleibende p53-Zielgenexpression zu erklären (Wulf et al., 2002, Zheng et al., 2002, Zacchi et al., 2002). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die virusinduzierte Akkumulation von TAp73 in den infizierten Zellen. TAp73, ein Homologes von p53, kann mit p53 Heterooligomere bilden (Gaiddon et al., 2001, Strano et al., 2002). Sollten diese Heterooligomere transkriptionell inaktiv sein?

In Abhängigkeit der p53-Akkumulation beobachteten wir Apoptose bei gleichzeitiger Abwesenheit des viralen Apoptose-Antagonisten E1B-19k. Diese p53-vermittelte Apoptose findet - im Widerspruch zu der klassischen Meinung - ganz ohne p53-induzierte Genaktivierung statt. In unseren Experimenten beobachteten wir p53-abhängige Apoptose auch Gegenwart von ΔN -Varianten von p73, also etablierten Antagonisten der p53-vermittelten Transkription (Fillipovich, et al., 2001, Grob et al., 2001, Stiewe et al., 2002, Kartasheva et al., 2002). Unsere Ergebnisse reihen sich damit in eine wachsende Anzahl von Publikationen ein, die den Eindruck vermitteln, für die Induktion von Apoptose sei eine transkriptionelle Aktivität von p53 nicht unbedingt erforderlich (Caelles et al., 1994, Wagner et al., 1994, Haupt et al., 1995). Im Gegenteil wurde vorgeschlagen, daß erst wenn die p53-Akkumulation nicht mehr in einer p21^{Cip1/Waf1}-Induktion resultiert, die p53-Überexpression in die Apoptose mündet (Gorospe et al., 1997). Das würde bedeuten: Die p21-Expression entscheidet über das Schicksal der Zelle. Findet sie statt - d. h. ist Transkription noch möglich - so gibt der Wachstumsarrest der Zelle Gelegenheit, die DNA-Schäden zu beheben. Kann p21 aber nicht mehr induziert werden (d. h.: Ist das Ausmaß der Schäden nicht abzuschätzen), so führt die p53-Expression - zum Selbstschutz - in den Zelltod (Chiou et al., 1997, Thomas et al., 1998, Bulavin et al., 1999, Ceballos et al., 2000, Mahyar-Roemer et al., 2001, Seoane et al., 2002). Jüngst wurde die Relokalisation von p53 in die innere Mitochondrien-Membran als alternativer, transkriptionsunabhängiger Mechanismus für eine p53-vermittelte Apoptose verantwortlich gemacht (Marchenko et al., 2000, Regula et al., 2001, Mihara et al., 2003). Wir selber jedoch konnten in der

Immunfluoreszenz eine - auch nur bruchteilhafte - Umordnung des zellulären p53 in die Mitochondrien nicht überzeugend darstellen.

Obwohl wir alle Werkzeuge beisammen hatten: Eine Doppelmutante, die in Abhängigkeit von p53 verstärkt in Apoptose geht, so konnten wir dennoch keinen einschneidenden Effekt auf die Virusvermehrung bemerken. Wir haben diesen überraschenden Befund in verschiedenen Zelllinien und auch unter den Bedingungen einer massiven Überexpression von p53mt24-28 in Ad Δ E1B-19k-infizierten Zellen immer wieder erhalten. Trotz einer geradezu vollständigen Apoptose mit massivster Zellschädigung führte dies dennoch kaum zu einer Verminderung der Virusaussbeute. Damit wurde natürlich unser ursprüngliches Konzept obsolet. Wir wollten ein Virus konstruieren dessen Replikation sensitiv gegenüber einer einsetzenden Apoptose ist. Würden Tumorzellen mit einem solchen Virus infiziert, so könnte sich das Virus dort ungestört vermehren, aufgrund der Inaktivität von p53, welche eine notwendige Voraussetzung für die Tumorentstehung ist. In dem umliegenden Normalgewebe hingegen sollte die frühe E1A-Genexpression zur einer Akkumulation des dort funktionellen p53 führen (Lowe et al., 1993a). Diese irreguläre p53-Akkumulation würde ermöglicht aufgrund der inaktivierenden Punktmutation in E1B-55k (R239A-Substitution) (Shen et al., 2001, Querido et al., 1997). Ihre volle apoptotische (und putative antivirale (Sauthoff et al., 2000, Ganly et al., 2001, Kim et al., 2002, Cuconati et al., 2002)) Wirkung würde die p53-Akkumulation dann dadurch bekommen, daß wir darüber hinaus auch den viralen Apoptose-Inhibitor E1B-19k aus dem Virusgenom deletierten (Debbas et al., 1993, Han et al., 1996). Aufgrund unserer Mutationen in dem Virusgenom ist es uns zwar gelungen, das Virus sensitiv gegenüber Apoptose zu machen und diese Apoptose auch in Abhängigkeit von dem p53-Status der infizierten Zelle erst entstehen zu lassen, doch reicht dies für ein therapeutisches Fenster nicht aus. Das Virus vermehrt sich trotz auch stärkster Apoptose mit nahezu unverminderter Effizienz.

Vielleicht ist das aber gar nicht so überraschend. Adenovirus ist kein umhülltes Virus. Anders als viele andere Viren kann es damit die infizierten Zellen nicht verlassen, indem sich ein Viruskapsid aus einer Membranausstülpung abkapselt ('buddet'). Um aus den infizierten Zellen wieder herauszugelangen, muß

Adenovirus diese lysieren. Es tut dies, indem es über ein Adenovirus-Death-Protein (ADP) genanntes Protein in den infizierten Zellen gezielt Apoptose auslöst (Tollefson et al., 1996). Dieser Prozess verläuft in unterschiedlichen Zellsorten unterschiedlich schnell: 911 Zellen sind praktisch nach 48 h schon komplett lysiert, doch über einen 5 bis max. 7 Tage laufenden Zeitraum gelangen Adenoviren aus jeder Zelle auch wieder hinaus, indem sie in den infizierten Zellen über ADP gezielt Apoptose auslösen. Trotzdem verfügen Adenoviren auch über ein anti-apoptotisches Protein, das E1B-19k Protein. Dieses verhindert offenbar, daß die infizierten Zellen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt durch immunotaktische Chemokine in den Zelltod geschickt werden (Gooding et al., 1991, Perez et al., 1998, Perez et al., 2000). Letztlich ist alles eine Frage des Zeitpunktes: 72 h nach Infektion wird E1B-19k quasi nicht mehr, ADP jedoch zunehmend exprimiert, nachdem die wohl kritische Anfangsphase im Schutz von E1B-19k überwunden wurde.

Zusammengefaßt können wir sagen: Es ist immer noch unklar, warum Adenoviren überhaupt p53 antagonisieren. In Kombination mit unserer nicht abbaubaren p53-Variante p53mt24-28 konnten wir jedenfalls trotz massiver Überexpression keinen negativen Einfluß dieses p53 auf die Replikation von wt-Adenoviren feststellen (Koch et al., 2001). Dennoch scheinen Adenoviren nicht nur einen, sondern mehrere Mechanismen zu besitzen, um p53 zu antagonisieren. Die direkte Bindung von E1B-55k verbunden mit einer Relokalisation des p53 in das Zytoplasma - die wir mit unserer E1B-55k Mutation R239A ausgeschaltet haben - ist nur eine davon. Auch E4 orf6 vermag an p53 zu binden (Dobner et al., 1996). Zusammen mit E1B-55k ermöglicht es den virus-induzierten proteasomalen Abbau von p53 (Querido et al., 1997, Steegenga et al., 1998). Andererseits fällt auf, daß das E1B-54kDa Protein eines anderen Adenovirus-Serotyps p53 gar nicht binden kann (Bernards et al., 1983b, Zantema et al., 1985b, van den Heuvel et al., 1990, van Heuvel et al., 1993, Grand et al., 1993, Grand et al., 1995). Zwar antagonisiert auch dieses *Ad12*E1B-54kDa p53 (indem es zusammen mit E4 orf6 p53 destabilisiert (Wienzek et al., 2000)), doch gibt es andererseits Fisch-Adenoviren, die gar kein E1B-55k kodierendes Gen besitzen (Benko et al., 2002, Davison et al., 2003). Dort, wie auch in *in vitro* Transformationsversuchen mit E1A, können sowohl E1B-19k, E4 orf6 oder

auch E4 orf3 das E1B-55k Protein als p53-Antagonisten funktionell teilweise ersetzen (Barker et al., 1987, Moore et al., 1996, Nevels et al., 1999).

Warum könnten Adenoviren im Lauf der Evolution p53-Antagonisten entwickelt haben? Die zentrale Aufgabe von p53 war es, die - streng regulierte - Induktion der *p21/CDKN1A*-Genexpression zu transaktivieren (Kern et al., 1992, El-Deiry et al., 1993). In der Tumorentstehung lag die zentrale Rolle von $p21^{Cip1/Waf1}$ noch darin, den G₁-Arrest der Zellen zu bewirken (Waldman et al., 1995, Bunz et al., 1998). In den virusinfizierten Zellen jedoch reicht bereits die Expression von E1A aus, um die Zellen in die S-Phase zu zwingen (Johnson et al., 1993), allerdings verbunden mit dem hohen Preis einer E1A-verursachten p53-Akkumulation (Lowe et al., 1993a, Braithwaite et al., 1990). Regulär müßte dies zu einem starken Anstieg der p21-Mengen in den infizierten Zellen führen. Genau das tritt aber nicht ein. Auf multiple Arten weiß das Adenovirus den p21-Anstieg in den infizierten Zellen zu verhindern. Ein Grund hierfür könnte darin bestehen, daß p21 nicht nur ein Inhibitor der pRb-Phosphorylierung ist, sondern auch ein PCNA-Antagonist ist (Waga et al., 1994). Dieses PCNA oder 'proliferating cell nuclear antigen' ist einer der ganz wenigen host-cell Faktoren, die für die *in vitro* DNA-Replikation notwendig sind. PCNA-Trimere bilden einen Ring, der es host-cell (und eben auch vielen viralen) DNA-Polymerasen erlaubt, während sie arbeiten, reibungsfrei auf dem DNA-Templatstrang entlangzugleiten. Gleichzeitig hält dieser Proteinring das DNA-Templat davon ab, weiter aufzuschmelzen, als es für die laufende leading- und lagging-Strand Synthese unbedingt erforderlich ist. Da $p21^{Cip1/Waf1}$ durch Anlagern an PCNA die Ausbildung dieser Ring-struktur verhindern kann, könnte dies ein Grund sein, warum das Adenovirus p53 (und damit die p21-Induktion) unterbindet.

In unseren doppelt mutanten Viren, aber auch in den Tripelmutanten, wo wir zusätzlich im E1A die p300- oder p400-Bindung eliminiert hatten, hatten wir stets eine Akkumulation des p53 beobachtet, nie jedoch eine transkriptionelle Induktion der p53-Zielgene. Die Kombination aus der die p53-Bindung aufhebenden Punktmutation in E1B-55k und der Deletion von E1B-19k, dem viralen Antagonisten der p53-vermittelten Apoptose, führte stets zu transkriptionell inaktivem p53. Gleiches galt aber auch für das Onyx-015-Virus mit ausschließlich

einer Deletion des E1B-55k-Leserahmens (Abb. 8): p53 akkumulierte, jedoch auch dort ohne transkriptionell aktiv zu sein. Hätten demnach doch die Zweifler rechtbehalten, jene Gruppen, die kurz nach Erscheinen des Bischoff-Papers (Bischoff et al., 1996) behaupteten, in ihren *in vitro*-Versuchen mit einem E1B-55k-deletierten Adenovirus eine Abhängigkeit der Virusreplikation von p53 nicht nachvollziehen zu können (Goodrum et al., 1998, Rothmann et al., 1998, Turnell et al., 1999, Harada et al., 1999)? Auf den ersten Anschein spricht der Erfolg des Onyx-015-Virus in der Klinik eher dagegen (Kirn et al., 1998, Heise et al., 1997, Heise et al., 2000a, Rogulski et al., 2000, Ganly et al., 2000). Kann man diese Diskrepanz zwischen Theorie und Praxis noch erklären?

Ein erster Hinweis zur mechanistischen Klärung stammt von Goodrum et al., (Goodrum et al., 1997). Dort wurde gefunden, daß in Hela-Zellen, also einer p53^{+/+} Zelllinie, nur 20% der infizierten Zellen Ad Δ E1B-55k tatsächlich replizieren, während sich das wt-Adenovirus in 100% der infizierten Zellen vermehren konnte. Dieser Anteil von 20 % entsprach genau den Zellen in S-Phase, d.h. nur in solchen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Infektion in S-Phase befanden, konnte sich Ad Δ E1B-55k replizieren (Goodrum et al., 1997). Wurden die Zellen vor der Infektion in S-Phase synchronisiert, dann konnten tatsächlich alle Zellen Ad Δ E1B-55k replizieren. Interessanterweise ist für die Replikation von Ad Δ E1B-55k schon früher ein kältesensitiver Phänotyp beobachtet worden (Ho et al., 1982, Leppard et al., 1989, Goodrum et al., 1998). Das heißt möglicherweise: Je weniger Zellen sich in S-Phase befinden (z. B. bei 32°C), desto schlechter kann sich das E1B-55k-defiziente Adenovirus vermehren. Wiederum andere Gruppen hatten beobachtet, daß Ad Δ E1B-55k auch bei Normaltemperatur gelegentlich eine Wachstumsdefizienz gegenüber Ad-wt aufweist, diese in anderen Zellen aber nicht reproduzieren können (Pilder et al., 1986a, Barker et al., 1987). Tatsächlich gibt es diese Wachstumsschwäche von Ad Δ E1B-55k immer nur in Hela Zellen (Harrison et al., 1977, Babiss et al., 1984, Shiroki et al., 1986, Bernards et al., 1986, Barker et al., 1987, Pilder et al., 1986b, Rothmann et al., 1998, Harada et al., 1999). Hela Zellen sind genotypisch p53^{+/+}, gemeinhin werden sie aber als funktionell p53^{-/-} betrachtet, da in ihr Genom der virale p53-Antagonist HPV 18 E6 stabil integriert ist (Schwarz et al., 1985) und p53 dort nicht transkriptionell aktiv ist (Scheffner et al., 1990, Löber et al.,

2002). Wäre es aber denkbar, daß diese E6-vermittelte Kontrolle über p53 im Zusammenhang einer Adenovirusinfektion zusammenbricht (Chiou et al., 1994)? Dann wären die beobachtete Wachstumsdefizienz von Ad Δ E1B-55k doch über eine p53-Abhängigkeit erklärbar. Diese würde jedoch teilweise überdeckt, da sich bei einem typischen Versuchsansatz ca. 20% der Zellen zufällig in S-Phase befinden, so daß der p53-vermittelte G₁-Arrest nicht greifen kann. Plötzlich erscheinen aber auch die Feststellungen der Zweiflergruppen an dem Onyx-Konzept (Goodrum et al., 1998, Rothmann et al., 1998, Turnell et al., 1999, Harada et al., 1999) in einem anderen Licht: Man hätte wachstumsarretierte Zellen verwenden müssen, um die Effekte von Bischoff et al. (Bischoff et al., 1996) zu reproduzieren. Ansonsten verwischen die 20% Producer-Zellen die meßbaren Wachstumsunterschiede selbst dann, wenn man - dank FCS stark proliferierende - primäre Zellen verwendet.

Für die therapeutische Wirksamkeit der onkolytischen Adenoviren, also in Gegenwart eines funktionellen Immunsystems, welches sich in Zellkultur kaum nachstellen läßt, ist das E1A-Protein mindestens ebenso wichtig wie E1B-55k. Zwar können die E1A-Proteine die Expression der MHC I-Genprodukte herunterregulieren, doch gilt dies nicht für alle Adenovirus Serotypen (Cook et al., 1984, Vaessen et al., 1986). Für den Onyx-Serotyp, also Adenoviren der Subgruppe C, gilt, daß bereits die E1A-Genexpression die Zellen zusätzlich anfällig macht gegenüber einer Lyse durch den Tumornekrosefaktor- α (Cook et al., 1986, Chen et al., 1987). Gerade Tumorgewebe ist aber oftmals infiltriert von Monozyten und Macrophagen. Hinzu kommt, daß das E1A-Protein ausgesprochen immunogen ist (Kast et al., 1989). Die durch das E1A-Protein der Subgruppe C induzierte Suszeptibilität der Zellen gegenüber Zytolyse durch natürliche Killerzellen (Walker et al., 1991, Cook et al., 1986) könnte erklären, warum Zellen, die mit dem E1A des Serotyps 5 transformiert wurden, trotz der Subversion der zellulären Wachstumskontrollregulation, keine (stabilen) Tumoren bilden können (Walker et al., 1991). Genau dieser Mechanismus könnte im Fall der onkolytischen Adenoviren in umgekehrter Richtung wirken. Die fehlende Fähigkeit gegenüber einem (funktionellen) Immunsystem, aus immortalisierten Zellen Tumoren aufzubauen, wird im Fall

der mit Adenovirus Subtyp C infizierten Zellen zu einer fehlenden Fähigkeit, Entartung aufrechtzuerhalten (Perez et al., 2003, Williams et al., 2004). Demnach überrascht es auch nicht, wenn bereits wt-Adenovirus erfolgreich für die Lyse von Zervixkarzinomen eingesetzt werden kann (Smith et al., 1956, Yohn et al., 1968, Zielinski et al., 1969). In dem Fall des Onyx-015-Virus, einem Hybrid aus den Adenovirus-Serotypen 2 und 5 (Barker et al., 1987), erhöht sich die Sensitivität gegenüber der T-Cell-spezifischen Immunantwort noch dadurch, daß es eine Deletion in der E3-Region aufweist (Jones et al., 1979, Gooding et al., 1988). Hierdurch fehlen Onyx-015 gegenüber Wildtyp drei Proteine, die dem Virus dabei helfen, die zelluläre Immunantwort abzuwehren (siehe Anhang).

7. Anhang

7.1. Zusammenfassung:

Viele Viren kodieren für Proteine, die früh in der Infektion eine Auflösung der Pml bodies bewirken. Adenovirus E4 orf3 führt zur Relokalisation von Pml, der strukturgebenden Komponente der Pml oncogenic domains (PODs), in filamentöse Strukturen. Dennoch konnte bisher für ein Ad Δ E4 orf3 kein Wachstumsphänotyp beobachtet werden. Dieser Abschnitt zeigt, daß ein Auflösen der Pml bodies keine Änderung der zellulären Transkription bewirkt. Interessanterweise jedoch sind Ad E4inorf3-infizierte Zellen, im Gegensatz zu Ad-wt-infizierten Zellen, sensitiv gegenüber einer Interferon- γ -, TNF- α - oder FasL-vermittelten Apoptose. Die Sensitivität gegenüber TNFR- oder fas-vermittelter Apoptose steht in keinem Zusammenhang mit der Insertionsmutation in E4 orf3. Ursächlich für den Apoptose-Phänotyp ist eine unerkannte Deletion der Gene E3-10.4k, E3-14.5k und E3-14.7k in dem Genom von Ad E4inorf3. Bereits in dem parentalen Virus zu Ad E4inorf3, Ad d/309, ist dieser Bereich der E3-Region durch Lachssperm-DNA ersetzt worden.

7.2. Summary:

Many viruses code for proteins that early after infection lead to the dissolution of Pml bodies. Adenovirus E4 orf3 causes the relocalization of Pml, the essential structural component of Pml oncogenic domains (PODs), to filamentous track-like structures. Nonetheless, Ad Δ E4 orf3 does not show a growth phenotype in cell culture. This report shows that adenovirus-mediated relocalization of Pml bodies does not lead to an alteration of cellular gene transcription. Interestingly, and contrary to Ad wt-infected cells, cells infected with Ad E4inorf3 become sensitive to apoptosis by interferon- γ , TNF- α or FasL. However, the acquired sensitivity towards these cytokine mediators of apoptosis is not related to the insertion mutation in E4 orf3. Rather, the additional deletion of the genes E3-10.4k, E3-14.5k and E3-14.7k from the Ad E4inorf3

genome is causative for the observed apoptosis phenotype. Likewise, cells infected with Ad *d/309* in which part of the E3 region has been replaced by a heterologous DNA sequence also become sensitive to TNF- α - or FasL-induced apoptosis.

7.3. Einleitung:

Adenoviren exprimieren ein Protein, E4 orf3, welches früh nach der Infektion eine intrazelluläre Struktur, die sogenannten Pml bodies, zerstört (Carvalho et al., 1995). Bei den Pml-bodies, auch genannt ND10, nuclear dots oder PODs, handelt es sich um nukleäre, fest matrix-assoziierte Strukturen. Die Funktion der Pml bodies ist immer noch reichlich unklar, postuliert wurden Rollen in der Transkriptionsaktivierung, bei Apoptosewegen und in der Proteinubiquitinierung (Wang et al., 1998b, Quignon et al., 1998, La Morte et al., 1998, Valian et al., 1998, Li et al., 2000). Strukturgebende Komponente dieser Pml bodies ist das Pml-Protein (Ishov et al., 1999). Welche weiteren Proteine Bestandteil der Pml bodies sind, ist überraschend unklar; immer wieder genannt werden Sp100 und Daxx (Ishov et al., 1999, Dyck et al., 1994, Weis et al., 1994, Koken et al., 1994). Das Pml Protein existiert sowohl in einer löslichen Form wie in einer unlöslichen Form. Nur wenn das Pml Protein an bestimmten Lysinseitenketten mit SUMO-Resten, das sind ubiquitinartige Seitenketten, isopeptidisch verknüpft ist, bildet es diese POD (Pml oncogenic domains) Strukturen (Müller et al., 1998).

Ursprünglich ist man durch eine seltene Leukämieart, die akute Promyelozytenleukämie (APL), auf das Pml Protein aufmerksam geworden (de Thé et al., 1991, Goddard et al., 1991, Kakuzika et al., 1991, Kastner et al., 1992, Pandolfi et al., 1991). Ursächlich für diese klonale Expansion weißer Blutzellen ist eine Chromosomentranslokation, wie man dies auch für andere Leukämiearten gefunden hat (Heisterkamp et al., 1983, Kamps et al., 1990, Nourse et al., 1990). Bei der Promyelozytenleukämie ist dies in der weit überwiegenden Zahl der Fälle eine Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17 (de Thé et al., 1991, Grignani et al., 1993, Seeler et al., 1999). Hierdurch wird ein verkürztes

Pml Protein mit dem Retinolsäurerezeptor, einem nukleären Transkriptionsfaktor, zu einem aberranten Pml-RAR α Fusionsprotein verknüpft (de Thé et al., 1991, Kakuzika et al., 1991, Kastner et al., 1992). Ähnlich wie bei der akuten lymphoblastoiden Leukämie der B-Vorläuferzellen sind die beiden Domänen des Fusionsproteins über eine repetitiv-helikale Linkerregion in einer Art und Weise verknüpft, daß beide Proteindomänen weitgehend autonom falten können. Für die t(15;17) Chromosomentranslokation der akuten Promyelozytenleukämie gilt, daß das resultierende Pml-RAR α Fusionsprotein Produkt einer dominant negativen Mutation ist (Tsai et al., 1993). Bereits die Mutation eines Allels führt demnach zu einem funktionellen knock-out auch des von dem anderen, noch intakten Allel kodierten Pml Proteins (Dyck et al., 1994, Weis et al., 1994, Koken et al., 1994).

Die Expression des Pml-RAR α Fusionsproteins führt zu der Zerstörung der Pml bodies, wodurch die normalerweise in den POD gehaltenen Proteine freigesetzt werden (Weis et al., 1994, Dyck et al., 1994). Allein durch die Expression von Pml-RAR α werden Monozyten zu Krebszellen transformiert, was zu der Hypothese geführt hat, das Pml Protein sei ein Onkogen (Mu et al., 1994, Koken et al., 1995). Interessanterweise vermag auch das Adenovirus diese Pml bodies zu zerstören, indem es das Protein E4 orf3 exprimiert. E4 orf3 weist eine hohe Homologie zu SUMO-1 auf, einem kleinen ubiquitinähnlichen Protein, mit dem Pml posttranslational kovalent modifiziert ist (Carvalho et al., 1994, Sternsdorf et al., 1997, Müller et al., 1998). Bereits die ektopische Expression von E4 orf3 ist ausreichend für eine Auflösung der Pml bodies. Das Pml Protein aggregiert zusammen mit E4 orf3 in aberranten fadenförmigen (filamentösen) Strukturen, die als 'tracks' bezeichnet werden (Carvalho et al., 1994).

Nicht nur Adenovirus kodiert für ein Protein, welches mit den Pml bodies interagiert, sondern eine Vielzahl von Viren besitzen ein Protein, welches entweder direkt Pml angreift oder indirekt zu einer Auflösung der Pml bodies beiträgt (Maul et al., 1994, Carvalho et al., 1994, Kelly et al., 1995). Im Fall der Herpesviren ist dies das immediate-early protein ICP0, welches die Auflösung der Pml

bodies bewirkt (Everett et al., 1994). Ebenso führt die Expression von IE-1 des Zytomegalievirus zu einer Disintegration der Pml bodies und einer gleichmäßigen Verteilung des Pml Proteins über den gesamten Zellkern (Korioth et al., 1996, Ahn et al., 1997). ICP0 und IE-1, selbst RING-Finger Proteine, tun dies, indem sie die SUMO-Modifikation von Pml verhindern (Müller et al., 1999) bzw. den proteasomalen Abbau von Pml befördern (Chelbi-Alix et al., 1999). Aber auch RNA-Viren, z. B. Arenaviren mit dem einzigen Nicht-Struktur Protein Z, einem RING-Finger Protein, besitzen einem Pml-Antagonisten, was den Eindruck bestärkt, Pml sei ein generell antivirales Protein (Borden et al., 1998).

Tatsächlich vermutet man, Pml sei ein Mediator der Interferonantwort, indem es bestimmte Gene, etwa TAP-1 und TAP-2, den 'transporter associated with antigen presentation', transkriptionell reguliert (Zheng et al., 1998). Hierzu paßt, daß die zellulären Pml-Mengen sowie Anzahl und Größe der Pml bodies nach Interferon-Stimulation stark zunehmen (Terris et al., 1995), wohingegen Tumorzellen meist ausgesprochen kleine Pml bodies aufweisen (Koken et al., 1995). Dennoch ist die Rolle von Pml als Transkriptionsfaktor keineswegs bewiesen (Wienzek et al., 2001, Doucas et al., 1999, Valian et al., 1998, Alcalay et al., 1998). Interessanterweise kann man mittels Pml-Überexpression, so wie sie natürlicherweise nach Virusinfektion der Nachbarzellen stattfindet (Lavau et al., 1995, Stadler et al., 1995), eine produktive Infektion dieser vorbereiteten Zellen mit VSV- oder Influenza-Viren verhindern (Chelbi-Alix et al., 1998). Dem steht entgegen, daß eine Adenovirusmutante, bei der selektiv der Leserahmen 3 der frühen Transkriptionseinheit 4 durch Insertionsmutation zerstört wurde (Ad E4inorf3) absolut keinen veränderten Wachstumsphänotyp aufweist (Huang et al., 1989, Bridge et al., 1990). Da Adenoviren auf der anderen Seite mit E4 orf3 über ein Protein verfügen, welches gezielt Pml antagonisiert, stellt sich die Frage: Was ist die Rolle von E4 orf3 in der Adenovirusreplikation?

7.4. Aufgabenstellung:

Die einzige Funktion, die man bisher dem E4 orf3 zuordnen konnte, ist seine Fähigkeit, das normalerweise in nukleären dots vorkommende Pml Protein in

filamentöse tracks zu relokalisieren (Carvalho et al., 1994). Hierdurch werden die in den PODs gehaltenen Proteine Sp100 und NDP55 freigesetzt und in die viralen Replikationszentren rekrutiert (Doucas et al., 1996). Das Fehlen von E4 orf3 hat keinen messbaren Einfluß auf die Effizienz der Adenovirusreplikation (Huang et al., 1989, Bridge et al., 1990). Man vermutet, daß es sich bei Pml um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte (Kastner et al., 1992, Doucas et al., 1993, Ahn et al., 1998, Zheng et al., 1998). Pml interagiert mit CBP, einem bekannten Kofaktor DNA-bindender Transkriptionsfaktoren (La Morte et al., 1998, Doucas et al., 1999, Wienzek et al., 2001). Welche Änderungen der Genexpression bewirkt also die An- bzw. Abwesenheit des Pml-Antagonisten E4 orf3 in der infizierten Zelle? Welches ist die Rolle von Pml während der Adenovirusinfektion? Gibt es Bedingungen, bei denen sich die Abwesenheit von E4 orf3 in den Ad E4inorf3-infizierten Zellen doch negativ auf die Replikationseffizienz der Viren auswirkt? Läßt sich über die Umformung der POD hinaus doch noch ein deutlicherer Phänotyp für Ad E4inorf3-infizierte Zellen beobachten?

Pml ist ein Zinkfinger-Protein. Es gehört zu der Untergruppe der RING-Finger Proteine, wo zwei Zn^{2+} Ionen in einem C_3HC_4 Arrangement gebunden gehalten werden (Borden et al., 1995). Pml weist damit Ähnlichkeiten zu Transkriptionsfaktoren auf, wo häufig Zinkfinger die DNA-Bindung vermitteln (Freemont et al., 1991). Weiterhin befinden sich in der Primärsequenz von Pml zwei B-Boxen, wie sie auch in Homeoboxproteinen, also Transkriptionsfaktoren der Embryonalentwicklung, gefunden werden (Borden et al., 1993, Torok et al., 2001). Darüber hinaus hat man in unmittelbarer Nachbarschaft der Pml bodies naszierende RNA gefunden (La Morte et al., 1998), auch wenn die dabei verwendete Nachweismethode nicht unumstritten ist (Boisvert et al., 2000). Eine zentrale coiled-coil Domäne befähigt Pml zur Homo- und Hetero-Oligomerisierung (Perez et al., 1993). Pml beeinflusst, auch wenn es nicht an RAR- α fusioniert ist, die Transkriptionsfaktoren des Retinolsäurewegs (Wang et al., 1998a). Die N-terminale Domäne von Pml weist Charakteristika einer Transkriptionsaktivierungsdomäne auf (Kakuzika et al., 1991, Kastner et al., 1992) und Pml interagiert mit CBP, einer Histonacetyltransferase und Transkriptionskofaktor (La Morte et al., 1998). Wir haben nun gefragt: Welchen Einfluß hat das Zerstören der Pml bodies auf die Transkription zellulärer Gene?

7.5. Ergebnisse:

7.5.1. Die An- oder Abwesenheit von E4 orf3 zeigt bei Analyse eines cDNA-Arrays der ersten Generation keinen Einfluß auf die Transkription zellulärer Gene.

Bereits 7 h nach Beginn der Adenovirusinfektion sorgt die dann einsetzende Synthese des frühen Phase Genproduktes E4 orf3 dafür, daß die ursprünglich punktförmigen Pml bodies in filamentöse tracks umorganisiert werden (Abb. 20 A vgl. uniniziert (links) mit Ad-wt Infektion (Mitte)). Da nur Pml zusammen mit E4 orf3 in diesen fadenförmigen tracks lokalisiert, werden die anderen POD Bestandteile wie etwa Sp100, NDP55 oder hDaxx freigesetzt (Doucas et al., 1996). Infiziert man die Zellen hingegen mit einer Insertionsmutante, Ad E4inorf3, so kann dieses Virus kein funktionelles Orf3 Protein mehr synthetisieren (Huang et al., 1989). Die einzige bisher feststellbare Folge dieser Mutation ist, daß in Zellen, die mit Ad E4inorf3 infiziert wurden, diese Pml bodies nicht mehr reorganisiert werden (Abb. 20 A, rechtes Bild).

Wir haben nun 10h nach Adenovirusinfektion, und damit 3h nach der vollständigen Reorganisation der Pml bodies, die Gesamt-RNA aus Ad E4inorf3-infizierten Zellen geerntet und mit dem Transkriptom wt-Adenovirus-infizierter Zellen verglichen. Die RNA wurde dazu in DNA umgeschrieben - hierbei wurde sie radioaktiv markiert - und anschließend gegen 1072 auf eine Nylonmembran gespottete Genfragmente hybridisiert. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Fig. 20 gezeigt (Fig. 20, vgl. B mit C) gezeigt. Auch bei einem Wiederholen des Experiments in verschiedenen Zelllinien und zu unterschiedlichen Zeitpunkten war keines der 1072 Gene auf dem Array um mehr als einen Faktor 1,8 herauf bzw. herunterreguliert (Daten nicht gezeigt, bzw. vgl Abb. 20 B mit Abb. 20 C). Ursprüngliche Kandidaten - β 4-integrin (CD104) und ezrin - ließen sich weder im Western blot noch auf anderen Zelllinien bestätigen (Daten nicht gezeigt). Auch die starke Überexpression von E4 orf3 unter Kontrolle eines heterologen Promotors - mittels Zweitgenerationsadenovirusvektor - führte im Vergleich zu Ad

II-GFP-transduzierten Zellen zu keiner gemessenen Änderung in der zellulären Genexpression (Daten nicht

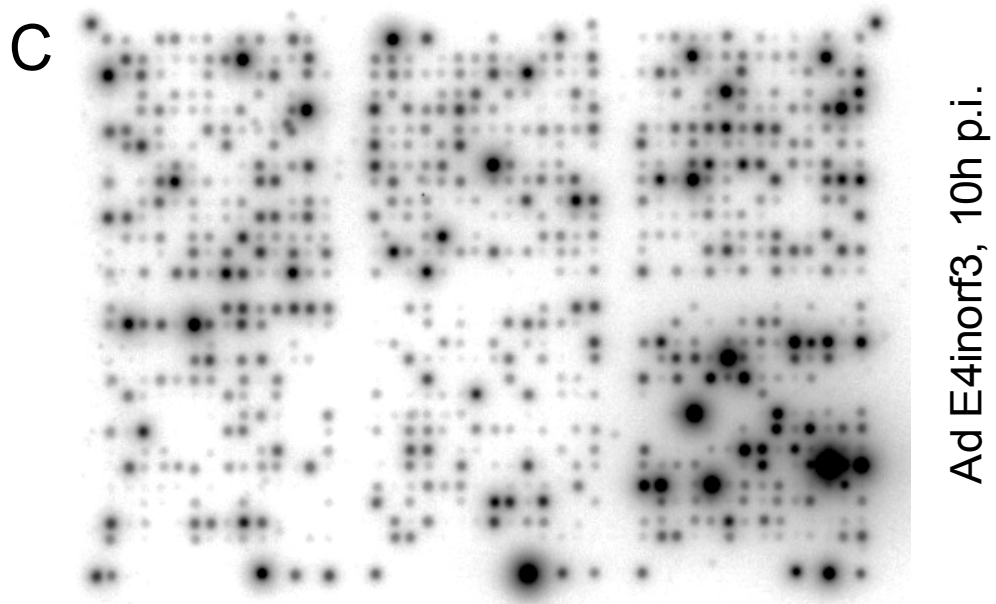
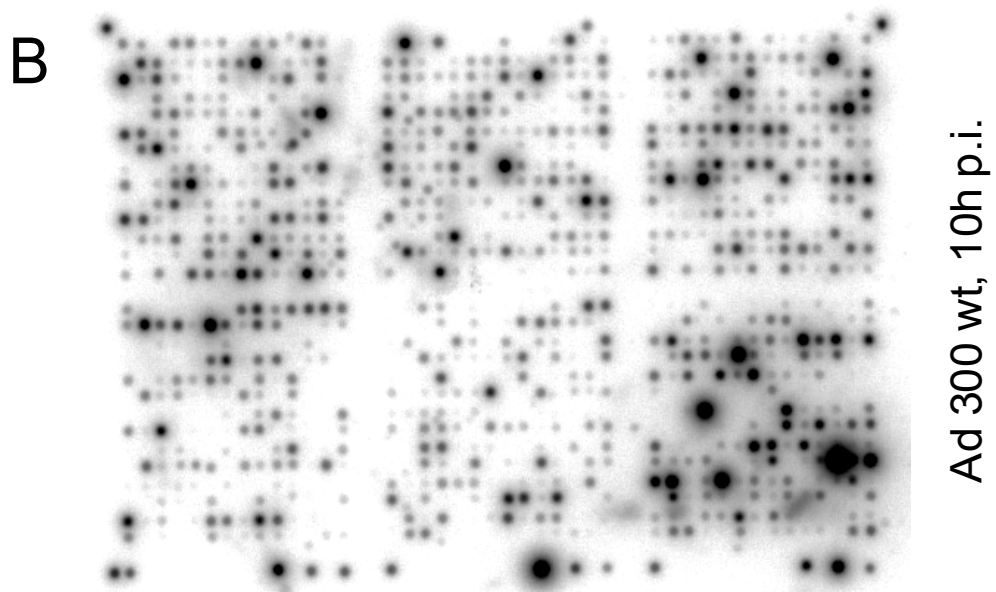
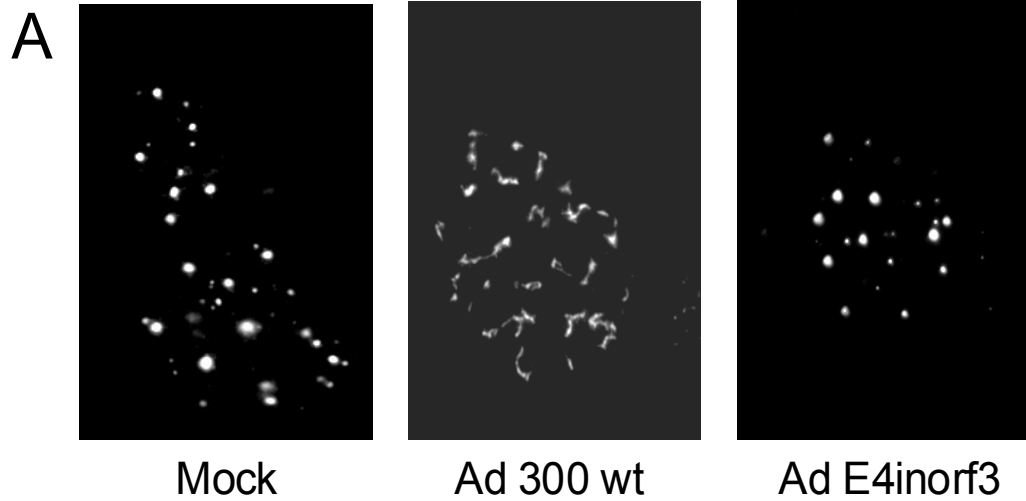


Abb. 20. Adenovirus infizierte Zellen zeigen eine Umorganisation der Pml bodies, nicht jedoch Zellen, die mit einem E4 orf3-losen Virus infiziert wurden. Trotz dieser augenfälligen Unterschiede treten bei der Transkriptom-Analyse keine Veränderungen in der Genexpression auf. (A) Hep-2 Zellen wurden in 4-well Objekträgern ausgesäht und entweder uninfiziert gelassen (1), mit wt-Adenovirus (2) oder einer Adenovirusmutante mit einer Insertionsmutation im offenen Leserahmen 3 der frühen Transkriptionseinheit 4 (Ad E4inorf3) mit einer m.o.i. von 5 infiziert. 7h nach Infektion wurden die Zellen immungefärbt (mab PG-M3 α -Pml). **(B)** Hep-2 Zellen wurden mit Ad-wt 300 mit einer m.o.i von 50 infiziert. 10h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Die RNA wurde radioaktiv markiert und mit 1072 überwiegend krebsrelevanten cDNAs hybridisiert. Diese Nylonmembran wurde über Nacht exponiert und am Bioimager ausgewertet. **(C)** wie (B), doch wurden die Zellen mit Ad E4inorf3 infiziert.

gezeigt). Die virusinduzierte Zerstörung der Pml bodies hat somit in diesem System keine detektierbare Auswirkung auf die Transkription zellulärer Gene. Dies läßt es insgesamt unwahrscheinlich erscheinen, daß es sich bei Pml um einen Transkriptionsfaktor handelt.

7.5.2. Nach Interferon- γ Behandlung gehen Ad E4inorf3-infizierte Zellen in Apoptose.

Von murinem Pml ist behauptet worden, es sei ein Transkriptionsfaktor spezifisch für die Proteasomenuntereinheiten LMP-2 und LMP-7 sowie die Gene *TAP-1* und *TAP-2*, dem Peptidtransporter der MHC Klasse I Antigenpräsentation (Zheng et al., 1998). Auf der anderen Seite sind die Pml bodies interferon-induzierbar (Terris et al., 1995, Lavau et al., 1995). Möglicherweise war unser *in vitro* Zellkultursystem, ein Versuchsansatz, der das Immunsystem unberücksichtigt läßt, einfach nicht geeignet, einen weitergehenden Phänotyp für Ad E4inorf3 zu detektieren.

Gab man nun 24h vor Infektion Interferon- γ auf die Zellen - quasi um eine Virusinfektion der Nachbarzellen vorzutäuschen - so beobachtete man ein Abkugeln und schließlich Ablösen selektiv der Ad E4inorf3-infizierten Zellen. Diese virus- und interferonbedingte Zellschädigung trat nicht auf, bei Zellen, die mit

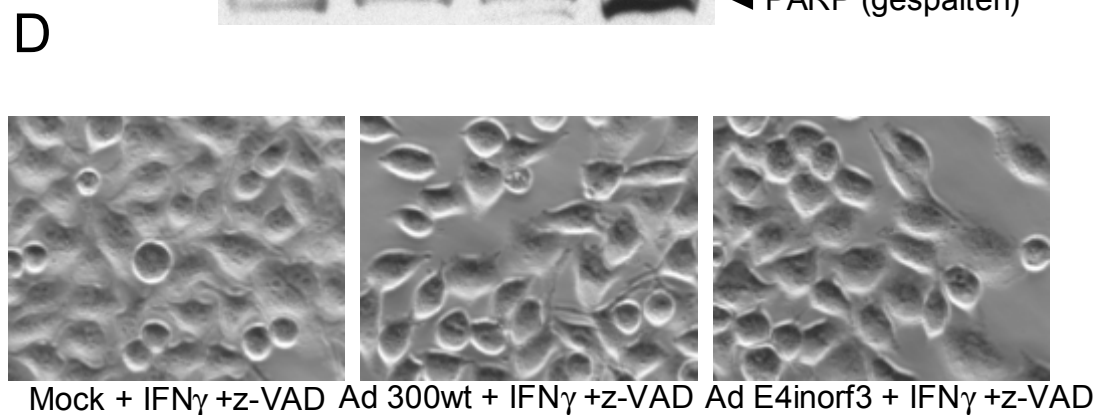
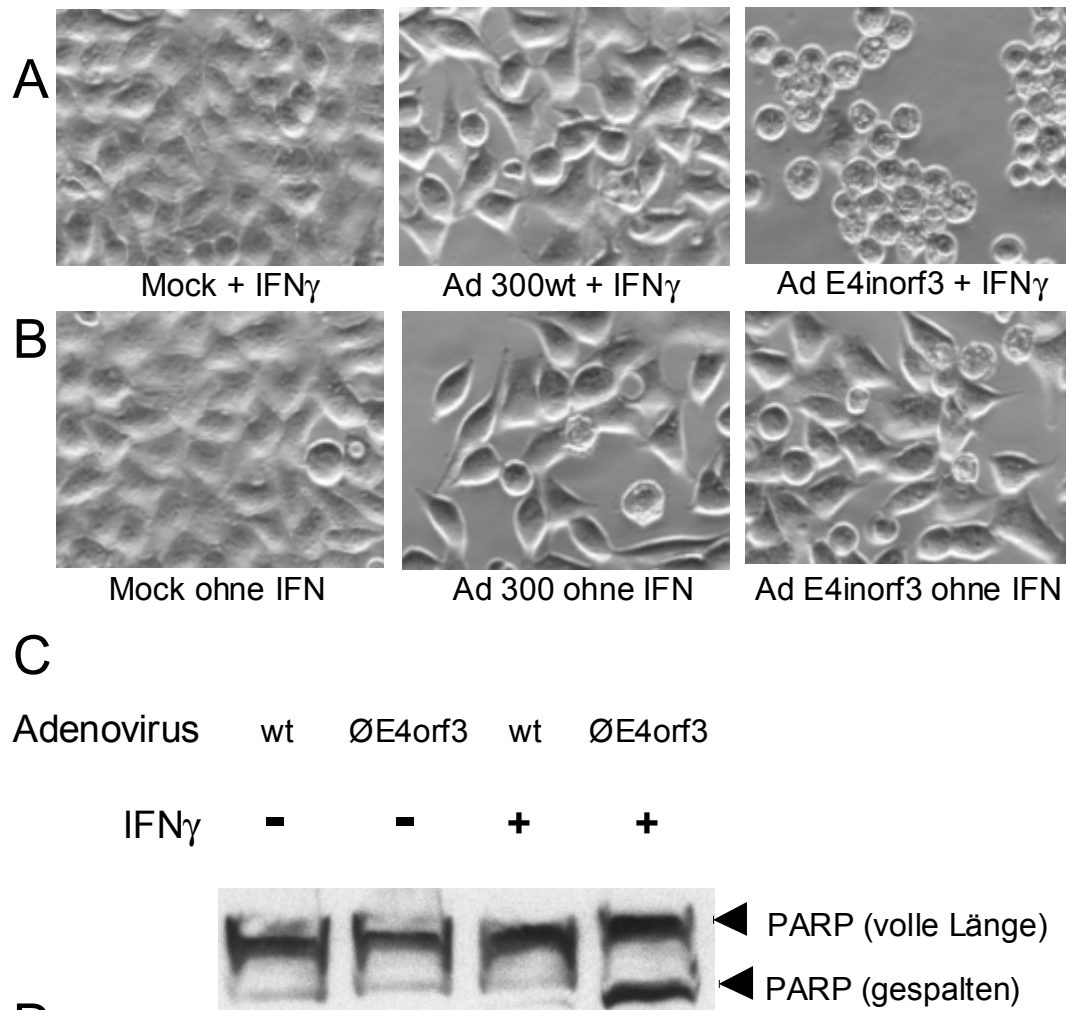


Abb. 21. In Gegenwart von Interferon- γ gehen Ad E4inorf3-infizierte Zellen in Apoptose, nicht jedoch wt-infizierte Zellen. (A) Hela Zellen wurden 24h

vor Infektion mit 2000 U/ml Interferon- γ präinkubiert. Anschließend wurden sie in Gegenwart von Interferon- γ entweder uninfiziert gelassen oder mit Adenovirus wt-300 bzw. Ad E4inorf3 infiziert (m.o.i.=10). 24h p.i. wurden die Zellen im Lichtmikroskop betrachtet. **(B)** Zellen wie in (A), doch ohne Interferon- γ . **(C)** Die Zellen wurden infiziert bzw. mit Interferon- γ (1000 IU/ml) präinkubiert wie über der Abb. angegeben. 24h p.i. wurden die Zellen in RIPA / 8M Harnstoff geerntet, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und gegen PARP geblottet (mab-2, Oncogene Res.). **(D)** Zellen wie in (A) wurden ab Infektion mit 100 μ M z-VAD behandelt. Die Aufnahmen entstanden 24 h p.i. dem wt-Adenovirus infiziert worden waren (Abb. 21 A + B). In der Tat handelt es sich hierbei um Apoptose, wie in einem PARP-Blot gezeigt werden konnte (Abb. 21 C). Infizierte man Hela Zellen in Abwesenheit von Interferon- γ mit Ad E4inorf3, so konnte man keine PARP-Spaltung beobachten (Abb. 21 C, Spur 2, vgl. Abb. 21 B rechtes Bild). Im Gegensatz hierzu trat das charakteristische PARP-Fragment, ein Nachweis einsetzender Apoptose, in den Zellen auf, die vor der Ad E4inorf3-Infektion mit Interferon- γ vorbehandelt worden waren (Abb. 21 C, 4. Spur). Apoptose ließ sich unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nie nachweisen, wenn die Zellen mit Adenovirus Wildtyp 300 infiziert worden waren (Abb. 21 C, Spur 1 und Spur 3). Behandelte man die Zellen ab Beginn der Infektion mit dem Caspase-Inhibitor z-VAD, so trat das apoptotische Ablösen und Verschrumpeln der interferonbehandelten und Ad E4inorf3-infizierten Zellen nicht mehr auf (Abb. 21 D). Ad E4inorf3-Infektion führt zu einem Phänotyp, der über das - bisher folgenlose - Umstrukturieren der Pml bodies hinausgeht. Werden Hela Zellen mit Interferon- γ vorbehandelt, so gehen sie nach Ad E4inorf3-Infektion selektiv in Apoptose.

7.5.3. Fas-Ligand und Tumornekrosefaktor- α haben keinen Einfluß auf wt-Adenovirus-infizierte Zellen, während sie Ad E4inorf3-infizierte massiv schädigen.

Fas-Ligand (FasL) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sind weitere chemotaktische und antivirale Proteine des angeborenen Immunsystems (Orlinick et al., 1998). Im immunkompetenten Organismus werden sie von den zytotoxischen T-Zellen zur Lyse virusinfizierter Zellen abgegeben. Die Zugabe von FasL führt zu einer Multimerisierung des fas-Rezeptors (Nagata et al., 1995, Ju et al.,

1995). FasL kann man also dadurch ersetzen, daß man einen multimeren (IgM) Antikörper gegen den Rezeptor (fas) in das Zellkulturmedium gibt (Dhein et al., 1992). FasL (als monoklonaler Antikörper (mab) ch-11) und TNF- α führten in unseren Experimenten - morphologisch betrachtet - zu einer noch sehr viel stärkeren antiviralen Wirkung gegen Ad E4inorf3-infizierte Zellen als Interferon- γ (Abb. 22 A und B). Bereits 7h nach Infektion sind die Ad E4inorf3-infizierten Zellen bei Zugabe von sowohl FasL als auch TNF- α massiv

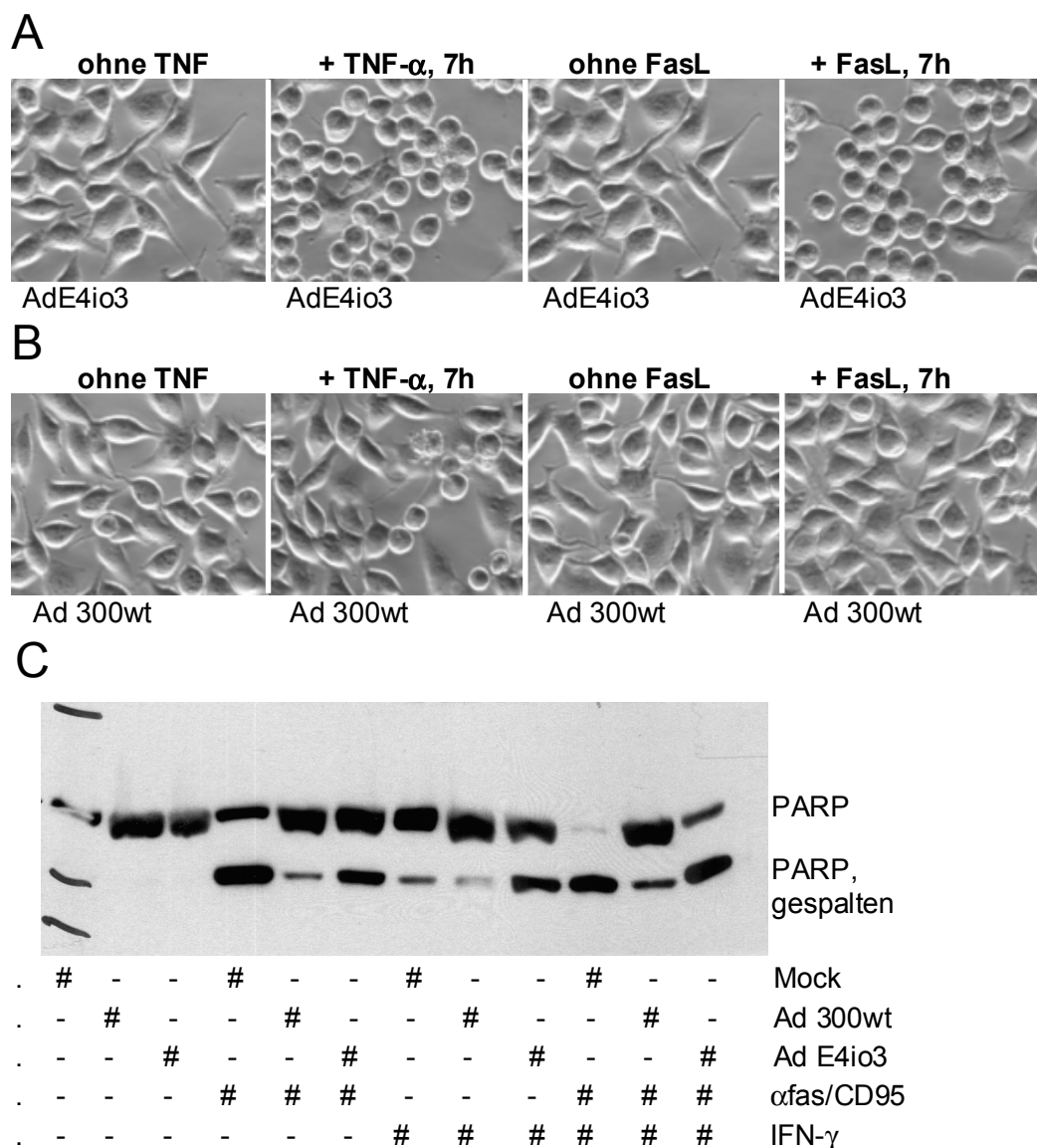


Abb. 22. Auch fas und TNF- α führen zu massiver Apoptose in den Ad E4inorf3-infizierten Zellen, nicht jedoch in Ad-wt 300-infizierten Hela Zellen. (A) Hela Zellen wurden entweder uninferiert gelassen, mit Adenovirus wt-300 infiziert oder Ad E4inorf-3-infiziert (m.o.i = 7). Mit Beginn der Infektion wurden die Zellen mit 10 ng TNF- α / ml Medium behandelt. **(B)** Infektion der

Zellen wie in (A), doch Behandlung mit α -Fas mab ch-11 (50 ng / ml Medium). **(C)** Hela Zellen wurden infiziert wie angegeben. Gleichzeitig wurde dort, wo angegeben, mit 50 ng α -Fas mab ch-11 / ml versetzt (ab Beginn der Infektion), oder mit 1000 IU Interferon- γ / ml (ab 24h vor Infektionsbeginn) behandelt, oder mit beidem, wie angegeben. 24h p.i. wurden die Zellen in RIPA / 8 M Harnstoff geerntet, durch SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet, gefolgt von einer Färbung gegen PARP.

geschädigt (Abb. 22 A Spur 2 und Spur 4), nicht jedoch die Ad wt-infizierten Zellen (Abb. 22 B Spur 2 und Spur 4). Das apoptotische Abkugeln beginnt in Gegenwart von FasL und TNF- α deutlich früher als es bei Interferon- γ der Fall war.

Auch hier haben wir den Einfluß von FasL und TNF- α auf die PARP-Spaltung getestet (Abb. 22 C). Während Infektion mit wt-Adenovirus zu einer Verminderung der durch FasL ausgelösten Apoptose führt (Abb. 22 C Spur 5 und Spur 11), kann Ad E4inorf3 die in Gegenwart dieser Chemokine ausgelöste Apoptose deutlich schlechter aufhalten (Abb. 22 C Spur 6 und Spur 12). In Gegenwart von Interferon- γ ist die meßbare PARP Spaltung 24h nach Infektion in den Ad E4inorf3-infizierten Zellen deutlich stärker als in den uninfizierten ('Mock', Abb. 22 C vgl. Spur 9 und Spur 7). Wenn sich im PARP-Blot 24h p.i. die morphologisch sehr deutlichen Unterschiede der Ad E4inorf3-infizierten Zellen 7h p.i. nicht so recht darstellen lassen, so mag das daran liegen, daß auch Ad E4inorf3 ja noch über das anti-apoptotische Protein E1B-19k verfügt. Dieses verhindert - anders als in den uninfizierten Zellen - die durch das trunkierte Bid über die Bax und Bak-Oligomerisierung ausgelöste Depolarisation der Mitochondrien (Gooding et al., 1991, White et al., 1992, Sundararajan et al., 2001, Perez et al., 2000). Somit stehen den Ad E4inorf3-infizierten Zellen auch auf längere Sicht nur die Apoptosewege zur Verfügung, die direkt von Caspase-8 und Caspase-9 zu den Effektorcaspasen führen. Eine Depolarisation der Mitochondrien und allgemeine, Apaf-1-vermittelte Apoptose kann dort - anders als in den uninfizierten Zellen - nicht auftreten.

In Abb. 23 A ist schematisch ein Virusvektor gezeigt, der E4 orf3 unter Kontrolle eines starken heterologen Promotors exprimiert, während ihm sein endogenes E4 orf3 fehlt. Wir haben nun versucht, das Fehlen des E4 orf3 Proteins in dem Virus Ad E4inorf3 zu transkomplementieren. Hierzu wurden Zellen entweder mit Ad-wt 300 oder der Insertionsmutante Ad E4inorf3 infiziert. Gleichzeitig wurden sie mit Zweitgenerationsvektoren transduziert, die ent-

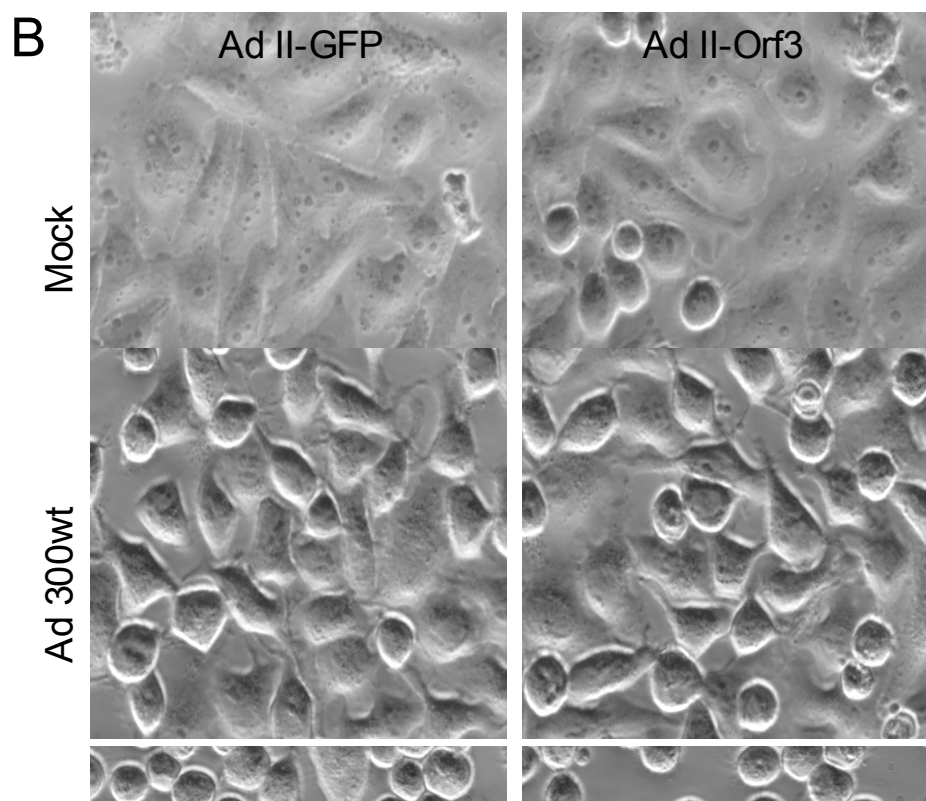
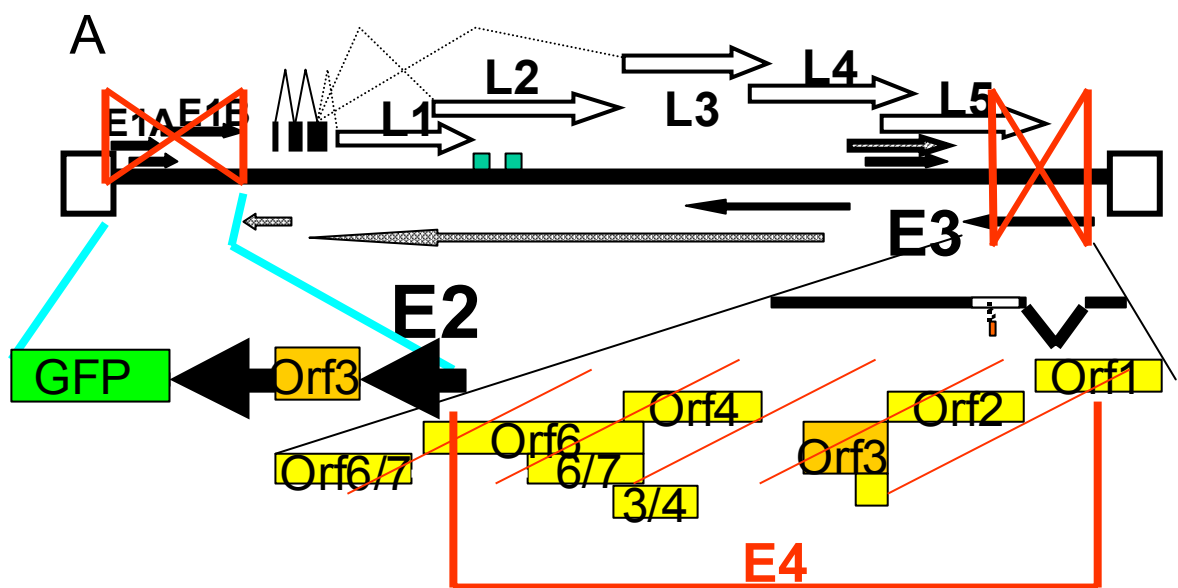


Abb. 23. Ein adenoviraler Zweitgenerationsvektor, der E4 orf3 unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert, ist *nicht* in der Lage, Ad E4inorf3-infizierte Zellen in Gegenwart von FasL phänotypisch zu komplementieren. (A) Schematische Darstellung des E4 orf3 unter einem heterologen Promotor überexprimierenden adenoviralen Zweitgenerationsvektors. Gezeigt ist eine schematische Darstellung des gesamten Adenovirusgenoms mit den frühe Phase Transkripten E1 bis E4 und den späte Phase Transkripten L1 bis L5. Um Platz für das Fremdgen (E4 orf3 + egfp bzw. nur egfp) zu schaffen, wurde die gesamte E1-Region deletiert. Auch die komplette E4-Region wurde aus dem Vektor entfernt, um eine Transkomplementation der Ad E4inorf3-infizierten Zellen zu verhindern. **(B)** Hela Pml⁺⁺-Zellen wurden 24h vor Infektion zur Induktion der Pml-Überexpression in Medium ohne 50 µg / ml Doxycyclin gegeben. Anschließend wurde uninfiziert gelassen, mit Adenovirus wild-typ 300 oder Ad E4inorf3 infiziert (m.o.i. = 5) und gleichzeitig mit Ad II-GFP (m.o.i. = 25) infiziert. Mit Beginn der Infektion wurde mit dem FasL-Analogen ch-11 (50 ng / ml) versetzt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden 9 h p.i. **(C)** Ansatz wie in (B), doch wurde das Fehlen von E4 orf3 mittels des Zweitgenerationsvektors Ad II-Orf3 (m.o.i. = 25) komplementiert.

weder nur das verstärkt grün fluoreszierende Protein (egfp) (Ad II-GFP in Abb. 23 B) oder zusätzlich noch E4 orf3 exprimieren (Ad II-Orf3 in Abb. 23 C). Vollkommen überraschen-derweise war es mit Ad II-Orf3 *nicht* möglich, den in Gegenwart von FasL (und TNF- α , nicht gezeigt) beobachteten Phänotyp zu revertieren (Abb. 23 C, unten). Auch nach Transkomplementation der 'E4 orf3-Mutante' Ad E4inorf3 gingen die Ad E4inorf3-infizierten Zellen in Gegenwart von FasL (und TNF- α) immer noch in Apoptose, d. h. sie kugelten sich bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt ab, lösten sich von der Zellkulturschale (Abb. 23 C, unten) und die Virusausbeute blieb auch bei Transkomplementation mit Orf3 stark vermindert (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legten nahe, daß Ad E4inorf3 neben der bereits bekannten Mutation in Orf3 noch weitere Mutationen aufweist, die sie von Ad-wt 300 unterscheiden.

7.5.5. Die Deletions-Insertionsmutante Ad dl309 zeigt in Gegenwart von TNF- α und FasL einen Apoptose-Phänotyp, der identisch zu dem Ad E4inorf3-infizierter Zellen ist.

Adenovirus besitzt Proteine, die adenovirusinfizierte Zellen vor der Lyse sowohl durch TNF- α als auch durch FasL schützen. Diese Proteine lokalisieren zusam-

men mit weiteren Immunevasionsmechanismen in der E3-Region des Adenovirus (Wold et al., 1995). Interessanterweise ist die gesamte E3-Transkriptionseinheit TNF- α -induzierbar (Deryckere et al., 1996). Das 14.7k Protein der E3 Region schützt infizierte Zellen vor der Lyse durch TNF- α , indem es das Andocken der Caspase-8 (FLICE) an den zytoplasmatischen Teil des aktivierten, trimerisierten TNF-Rezeptors-1 (CD 120a) verhindert (Gooding et al., 1988, Gooding et al., 1990, Chen et al., 1998). Mit E3-10.4k und E3-14.5k besitzt Adenovirus zwei weitere Proteine, die adenovirusinfizierte Zellen vor der Lyse durch FasL sowie TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) schützen (Shisler et al., 1997, Tollefson et al., 2001, Tollefson et al., 1998). Das Heteromer aus E3-10.4k und E3-14.5k induziert die Internalisierung und lysosomale Degradation des Fas-Rezeptors (auch genannt CD95 / Apo1) (Shisler et al., 1997, Elsing et al., 1998, Tollefson et al., 1998) sowie weiterer Rezeptoren (TRAIL-Rezeptor (Apo2L), EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) (Tollefson et al., 2001, Carlin et al., 1989, Tollefson et al., 1991, Hoffmann et al., 1994). Ad *d/309* ist eine Adenovirusmutante, welche die genannten drei Proteine, E3-10.4k, E3-14.5k sowie E3-14.7k nicht mehr exprimiert. Die E3B Region ist in diesem Virus deletiert und durch eine heterologe DNA Sequenz ersetzt worden (Bett et al., 1995).

Es galt nun, zu unterscheiden, ob der beobachtete Phänotyp von Ad E4inorf3 (Apoptose der virusinfizierten Zellen nach Gabe von TNF- α oder FasL) auf die Mutation in Orf3 oder einer (nicht deklarierten) Mutation in der E3-Region von Ad E4inorf3 zurückzuführen ist. Hierzu haben wir Hela Zellen infiziert, entweder mit dem Wildtypstamm der Subgruppe C, Serotyp 5, Ad 300-wt, oder den hiervon abgeleiteten Mutanten, Ad *d/309* mit einer Deletion der E3B-Region (Jones et al., 1979a, Bett et al., 1995), oder Ad E4inorf3, einem Derivat von Ad 300-wt mit einer Leserasterverschiebung im offenen Leserahmen 3 der frühen Transkriptionseinheit 4 (Huang et al., 1989). Die Zellen wurden mit Beginn der Infektion mit TNF- α oder α -fas mab und Interferon- γ stimuliert. Die morphologischen Veränderungen charakteristisch für eine beginnende Apoptose wurden im Lichtmikroskop verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 gezeigt. Hieraus geht eindeutig hervor, daß Ad 300-wt-Infektion keine

morphologischen Veränderungen induzierte (Abb. 24, oberste Zeile) und daß sowohl Ad 300wt (Abb. 24, obere Zeile) als auch Ad d/309 (Abb. 24, mittlere Zeile) und Ad E4inorf3 (Abb. 24, untere Zeile) einen identischen Phänotyp aufwiesen: Nach Behandlung mit den Zytokinen kugelten sich die infizierten Zellen ab, lösten sich von der Zellkulturschale und gingen in Apoptose.

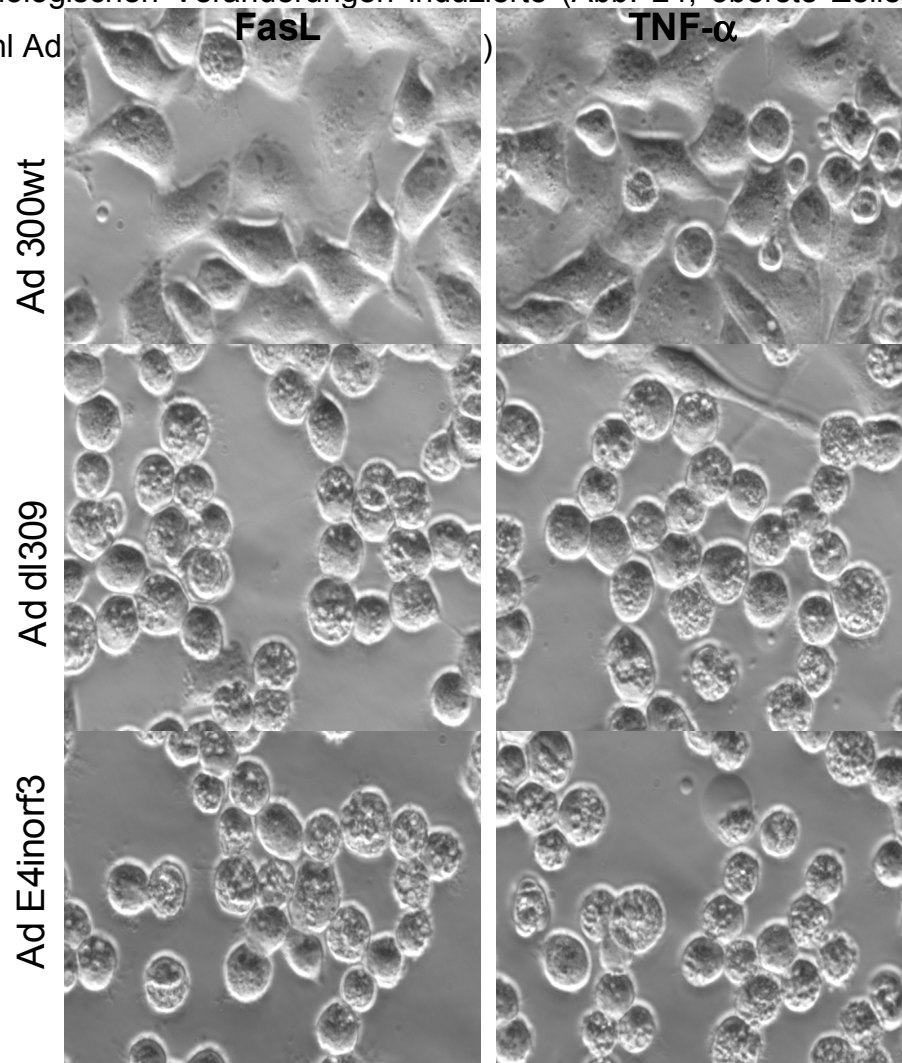
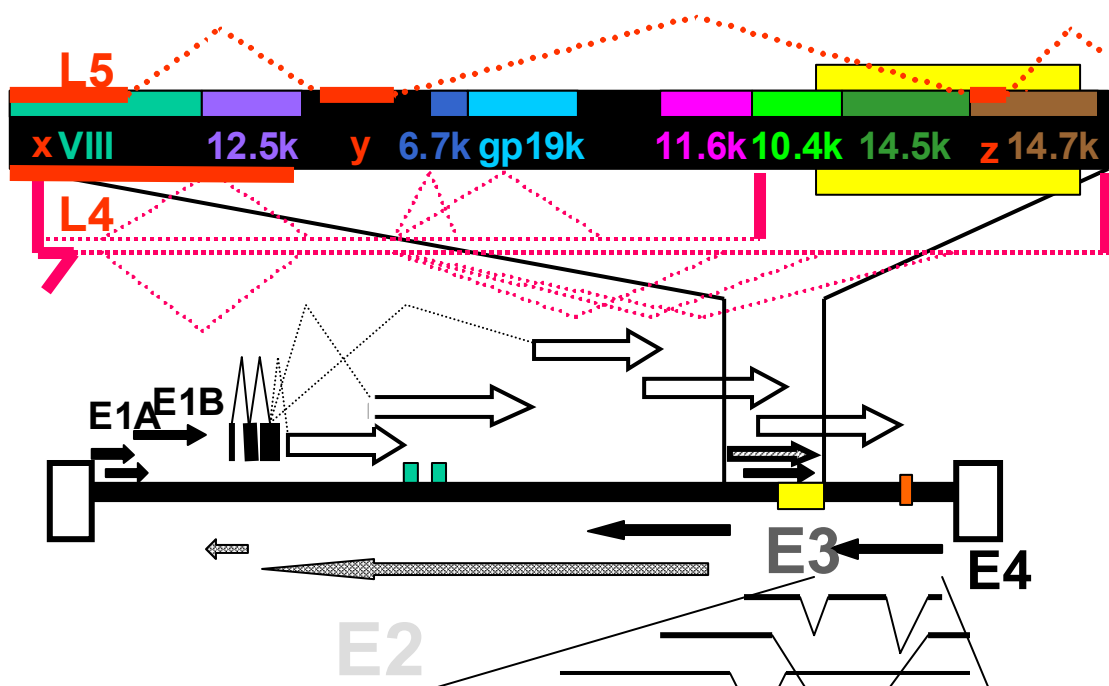


Abb. 24. Die Adenovirusmutante Ad d/309 verhält sich phänotypisch wie Ad E4inorf3. (A) HeLa Zellen wurden beginnend 24 h vor Infektion mit 2000 IU Interferon- γ / ml behandelt. Infiziert wurde entweder mit Adenovirus wt-300 oder Ad d/309 bzw. Ad E4inorf3. Beginnend mit der Infektion wurde zusätzlich mit 50 ng / ml ch-11 versetzt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden 9h p.i.. (B) Ansatz wie in (A) doch wurde anstelle von Interferon- γ und dem FasL-Analogon beginnend 0h p.i mit 10 ng / ml TNF- α behandelt. Gezeigt ist die Zellmorphologie 9h p.i..

Zeile) einen identischen Phänotyp aufwiesen: Nach Behandlung mit den Zytokinen kugelten sich die infizierten Zellen ab, lösten sich von der Zellkulturschale und gingen in Apoptose.

Diese Beobachtungen legten nahe, daß der mit der Mutante Ad E4inorf3 beobachtbare Phänotyp, die Sensitivität gegenüber FasL und TNF- α , gar nichts mit der geplant gesetzten Mutation in E4 orf3 zu tun hatte. Da sich die Mutante Ad E4inorf3 in allen Punkten wie Ad d/309 verhielt, deutete alles darauf hin, daß die Sensitivität gegenüber FasL und TNF- α letztlich auf eine Deletion der Gene E3-10.4k, E3-14.5k und E3-14.7k zurückzuführen ist. Wäre damit Ad E4inorf3 gar kein Abkömmling von Ad 300-wt sondern ein Derivat von Ad d/309? Letzte Klarheit konnte hier nur eine Sequenzierung der viralen DNA, isoliert aus Ad E4inorf3-infizierten Zellen bringen. Die Ergebnisse sind in Abb. 25 B gezeigt und führen zu dem in Abb. 25 A schematisch dargestellten Modell: Ad E4inorf3 stammt von Ad d/309 ab. Neben der geplant gesetzten Mutation in E4 orf3 (Abb. 25 A, orangene Markierung) weist Ad E4inorf3 zusätzlich noch eine Deletion der Gene E3-10.4k, E3-14.5k und E3-14.7k auf (Abb. 25 A, gelbe Markierung). Von diesen Genen ist bekannt daß sie den Fas- und TNF-Rezeptor internalisieren bzw. die Weiterleitung des TNF-Signals an Caspasen unterbinden (Burgert et al., 2000). Zwar wird das Fehlen der E3B-Region von den Konstrukteuren von Ad E4inorf3 nicht ausdrücklich erwähnt, doch weisen sie indirekt auf diesen Umstand hin, da sie angeben, die Synthese des Fiberproteins sei in der Mutante Ad E4inorf3 (auf unerklärliche Weise) stark erniedrigt (Huang et al., 1989). Dies könnte daran liegen, daß durch die Deletions- / Insertionsmutation von Ad d/309 neben den drei genannten Immunevasionsgenen auch ein mit 'z' bezeichnetes Intron des Fibergens (Abb. 25 A, rote Markierung) mit deletiert wurde.

A



B

Query: 18 agcctcatcactgtggtcatcgccctttatccagtgcattgactgggtctgtgtgcgcttt 77
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 29934 agcctcatcactgtggtcatcgccctttatccagtgcattgactgggtctgtgtgcgcttt 29993
 E3 RID-alpha 51 S L I T V V I A F I Q C I D W V C V R F

Query: 78 gcataatctcag 88
 ||||||||||
 Sbjct: 29994 gcataatctcag 30004
 E3 RID-alpha 71 A Y L R

Query: 731 gcattcactcaccttgtcaaggacctgaggatctctgcacccttattaagaccctgtgcg 790
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct: 30751 gcattcactcaccttgtcaaggacctgaggatctctgcacccttattaagaccctgtgcg 30810
 E3 14.7K 100 C I H S P C Q G P E D L C T L I K T L C

Query: 791 gtctcaaaga-cttattccctttaactaat 819
 |||||||||||
 Sbjct: 30811 gtctcaaagatcttattccctttaactaat 30840
 E3 14.7K 120 G L K D L I P F N ^^^

C

Query: 89 ctgctgccatgttgtgttctacatgttgtttcatgtgttctgctgcatgctcttctgcg 148
 |||||||||||
 Sbjct: 1 ctgctgccatgttgtgttctacatgttgtttcatgtgttctgctgcatgctcttctgcg 60

Query: 149 ccttagatctctctttatgtagtggtgtgtctctcttctgctgagtggtgttttctgc 208
 |||||||||||
 Sbjct: 61 ccttagatctctctttatgtagtggtgtgtctctcttctgctgagtggtgttttctgc 120

Query: 209 ctatatattttaatttttaataccaaaccctgtccccgagaggcctttgcgttctggta 268
 |||||||||||
 Sbjct: 121 ctatatattttaatttttaataccaaaccctgtccccgagaggcctttgcgttctggta 180

Query: 269 ggccgtcattgaaaactgacttaactcgttaaatnnnnnnnnnnnnnnntaatgggtg 328
 |||||||||||
 Sbjct: 181 ggccgtcattgaaaactgacttaactcgttaaatataaaaaatgtaaaaaataatgggtg 240

Query: 329 agactcagcccaacatcggcagatgaggtgagactcagcccaacatcggcagatg 388
 |||||||||||
 Sbjct: 241 agactcagcccaacatcggcagatgaggtgagactcagcccaacatcggcagatg 300

Query: 389 aggtggattgagactcaaccccaacattggcagatgaggtgaattagatgaggtggattg 448
 |||||||||||
 Sbjct: 301 aggtggattgagactcaaccccaacattggcagatgaggtgaattagatgaggtggattg 360

Query: 449 agactcatgaggggtgtatgagggcccgacgtccacaggtgggagttgtgctttacagtc 508
 |||||||||||
 Sbjct: 361 agactcatgaggggtgtatgagggcccgacgtccacaggtgggagttgtgctttacagtc 420

Query: 509 caacgtgcaggacgcttggcatttggcagagaaacaccaaagattggcaaattcgcaactgg 568
 |||||||||||
 Sbjct: 421 caacgtgcaggacgcttggcatttggcagagaaacaccaaagattggcaaattcgcaactgg 480

Query: 569 cgccctgtgctcttcacagacggaataatgaccaaactctgattattttgtaaaacgga 628
 |||||||||||
 Sbjct: 481 cgccctgtgctcttcacagacggaataatgaccaaactctgattattttgtaaaacgga 540

Query: 629 aaccgaatgtccgacaaagtctatttgatgacttcccggtaggtctgcctgcccgtggg 688
 |||||||||||
 Sbjct: 541 aaccgaatgtccgacaaagtctatttgatgacttcccggtaggtctgcctgcccgtggg 600

Query: 689 ccgacgcggtccgggaattttacaaacgatttcggacgtcta 730
 |||||||||||
 Sbjct: 601 ccgacgcggtccgggaattttacaaacgatttcggacgtcta 642

Abb. 25. Ad E4inorf3 stammt nicht von wt-300 ab, sondern ist ein Derivat von Ad dl309. (A) Schematische Darstellung des Ad E4inorf3 Genoms. Neben der geplant gesetzten Insertionsmutation in der E4 Region (Leserasterverschiebung in E4 orf3, orangene Markierung) weist das Ad E4inorf3-Genom auch eine Deletions-Insertionsmutation in der E3 Region auf (gelbe Markierung). Hierdurch werden die E3 Gene 10.4k, 14.5k und 14.7k zerstört. **(B)** Gezeigt ist ein Sequenzvergleich der Ad E4inorf3-DNA mit Ad-wt-300-DNA (M73260). Das Alignment ist zwischen den Basen 300004 und 30751 unterbrochen. **(C)** Gezeigt ist ein Sequenzvergleich der Ad E4inorf3-DNA mit Ad dl309-DNA. Die heterologe DNA Sequenz ersetzt die wt-Adenovirusbasen 300005 bis 300750.

7.6. Diskussion:

Obwohl von Pml gelegentlich behauptet wird, es sei sowohl ein Aktivator als auch ein Repressor der Transkription, konnten wir im Zusammenhang mit der virusinduzierten Zerstörung der Pml bodies keine Änderung der zellulären Genexpression beobachten. Warum so viele Viren, darunter auch Adenovirus mit E4 orf3, für einen Pml-Antagonisten kodieren und welche Bedeutung Pml bodies für den viralen Replikationszyklus haben, bleibt damit weiter unklar. Die Beobachtung, Ad E4inorf3-infizierte Zellen, nicht aber Ad 300-wt-infizierte, gingen nach Behandlung mit Interferon- γ , FasL oder TNF- α selektiv in Apoptose, gab den Studien eine vollkommen neue Richtung. Anfänglich ließ sich dies durchaus sehr gut mit dem Pml-Antagonismus erklären, wird doch Pml mit dem Auslösen des Zelltods in Verbindung gebracht (Quignon et al., 1998). Es gibt sogar Berichte, die sagen, für das Auslösen des programmierten Zelltods durch Fas, Tumornekrosefaktor- α oder Interferon- γ sei Pml notwendig (Wang et al., 1998b). Und weiter, Pml^{-/-} Zellen seien geschützt vor der durch anti-Fas-Antikörper ausgelösten Apoptose (Wang et al., 1998b). Unsere Ergebnisse geben für Ad E4inorf3-infizierte Zellen eine gänzlich andere Erklärung: Nicht das Fehlen des Pml-Antagonisten Orf3 ist für den Apoptose-Phänotyp verantwortlich, sondern eine Deletion in der E3-Region von Ad E4inorf3, die selbe Deletion, wie man sie auch in dem parentalen Virus Ad d/309 findet.

Wie kam nun die Deletion in Ad E4inorf3 zustande? Da die Deletion der E3 Gene nur nach Zugabe von Zytokinen einen Phänotyp aufweist (Gooding et al., 1988), ansonsten das Wachstum von Ad d/309 aber unter Zellkulturbedingungen überhaupt nicht verändert ist (Jones et al., 1979a), hat man lange Zeit Ad d/309 mit Ad 300wt gleichgesetzt. Offenbar hat aber in dem Labor der Ad E4inorf3-Konstrukteure (Huang et al., 1989) dann doch irgendwie Ad d/309 den Stock an Ad 300-wt überwuchert - zumindest wurde die Mutante (unwissentlich) ausgehend von Ad d/309 konstruiert. Unter der Annahme, Ad d/309 habe unter Zellkulturbedingungen keinen veränderten Phänotyp, bietet Ad d/309 gewichtige Vorteile gegenüber Ad 300-wt: Es besitzt nur eine (anstelle von 4) *Xba*I-Schnittstellen. Die eine, verbleibende *Xba*I-Schnittstelle bei 3.7 map units (m.u.)

befindet sich in einem essentiellen Gen (E1A) und konnte daher nicht wegmutiert werden (Jones et al., 1979a). Da es auf der anderen Seite Zelllinien gibt, die mit der E1-Region von Adenovirus transformiert worden sind - etwa 293 Zellen (Gallimore et al., 1974, Graham et al., 1977) -, kann man die (einzige verbleibende) *Xba*I-Schnittstelle des Genoms von Ad *d*/309 bequem dazu nutzen, Fremdgene hineinzuklonieren. Die entsprechenden Erstgenerations-Adenovirusvektoren kann man dann auf 293-Zellen anziehen, während sie andere Zellen (z.B. Hela Zellen) nur abortiv infizieren und ausschließlich das Fremdgen exprimieren (Jones et al., 1979a). In Abwesenheit von E1A werden keine weiteren viralen Gene exprimiert (Jones et al., 1979b). Ad *d*/309 ist also quasi ein 'verbessertes' Virus mit Wildtyp-Eigenschaften.

Ad *d*/309 leitet sich über zwei genau bekannte Zwischenstufen, Ad *sub*304 und Ad *d*/308, von Ad5 Wildtyp, genannt Ad 300, ab (Jones et al., 1978, Jones et al., 1979a). Jede dieser Mutanten wurde generiert, indem man Adenovirus DNA mit *Xba*I geschnitten hat und die erhaltenen Fragmente (anfänglich 5, am Ende 2) immer wieder in Hela-Zellen transfiziert hat. Zufallsmutationen an den nicht essentiellen *Xba*I-Schnittstellen boten hierbei einen Selektionsvorteil (Jones et al., 1978). Nacheinander sind somit die *Xba*I-Schnittstellen bei 84.8, 79.6 und 29.5 m.u. verloren gegangen (Jones et al., 1978, Jones et al., 1979a, Bett et al., 1995). Die *Xba*I-Schnittstelle bei 79.5 m.u. wurde einfach deletiert (Deletion der Ad5 Nukleotide 28597-28602). Dies führt zu keiner Leserasterverschiebung in dem betroffenen Gen - E3-6.7k -, wohl aber zu einer in-frame-Deletion der Aminosäuren 18 und 19 (Bett et al., 1995). Die *Xba*I-Schnittstelle bei 29.5 m.u. wurde durch eine 2 bp Deletion verloren (Ad5 10594-10595). Hierdurch wird die Initiation der PolIII-vermittelten Transkription der VAI-RNA beeinträchtigt (Thimmappaya et al., 1979). Diese VAI-RNA bindet und inhibiert die RNA-abhängige Proteinkinase (PKR) (Sharp et al., 1993), ein Teil des intrazellulären Verteidigungssystems gegen Viren (Clemens et al., 1994, Thimmappaya et al., 1982), und ist möglicherweise verantwortlich für die Interferon- γ -induzierte Apoptose adenovirusinfizierter Zellen (Michael Schümann, persönliche Mitteilung).

Die wohl interessanteste Mutation ist die, welche in Ad *sub304* zu einem Verschwinden der *Xba*I-Schnittstelle bei 84.8 m.u. geführt hat (Jones et al., 1978). Es handelt sich um eine Insertions-Deletionsmutation, wo 746 bp eines in Zellkultur nicht essentiellen Genomabschnitts (Ad5 30005-30750) durch 642 bp heterologer DNA-Sequenz ersetzt (aufgefüllt) wurde. Aufgrund der Substitution mit einem ähnlich großen Fragment an Fremd-DNA ist die Deletions-Insertion zwar im *Eco*R I und *Hind* III-Verdau anhand der Fragmentvarianz nur schwer zu erkennen, wurde aber dennoch bemerkt (Jones et al., 1978), dann aber ganz offensichtlich wieder vergessen (Huang et al., 1989). Interessanterweise handelt es sich bei dem Substitutionsfragment um Lachssperm-DNA (Bett et al., 1995). Mutmaßlich wurde Lachssperm-DNA von Jones et al. (Jones et al., 1978) als Füllreagenz für eine Calciumphosphat-Transfektion verwendet. Die Lachssperm-DNA inkorporierte an einer *Xba*I-Bruchstelle in das Adenovirusgenom und ersetzte dort die - unter Zellkulturbedingungen nicht essentiellen Gene - E3-10.4k, E3-14.5k und E3-14.7k (Cladaras et al., 1985a, Cladaras et al., 1985b). Bei Ad *sub304* fehlt dieser Abschnitt der E3-Region (Tollefson et al., 1988) und das Fehlen dieser 3 Gene führt dazu, daß die adenovirusinfizierten Zellen vor der TNF- α -vermittelten Lyse nicht mehr geschützt sind (Gooding et al., 1988).

8. Literatur

- Ahn J. H., Hayward G. S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.* **71**, 4599-4613.
- Ahn J. H., Brignole Jr. E. J., Hayward G. S. (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4899-4913.
- Alcalay M., Tomassoni L., Colombo E., Stoldt S., Grignani F., Fagioli M., Szekely L., Helin K., Pelicci P. G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1084-1093.
- Allart S., Martin H., Detraves C., Terrasson J., Caput D., Davrinche C. (2002). Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of deltaN-p73alpha. *J. Biol. Chem.* **277**, 29063-29068.
- Ard P. G., Chatterjee C., Kunjibettu S., Adside L. R., Gralinski L. E., McMahon S. B. (2002). Transcriptional regulation of the *mdm2* oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5650-5661.
- Avantaggiati M. L., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine A. S., Kelly K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell*, **89**, 1175-1184.
- Babiss L. E., Ginsberg H. S. (1984). Adenovirus type 5 early region 1B gene product is required for efficient shutoff of host cell protein synthesis. *J. Virol.* **50**, 202-212.
- Babiss L. E., Ginsberg H. S., Darnell Jr. J. E. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2552-2558.
- Bagchi S., Raychaudhuri P., Nevins J. R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: A novel mechanism for E1A transactivation. *Cell* **62**, 659-669.
- Baker S. J., Fearon E. R., Nigro J. M., Hamilton S. R., Preisinger A. C., Jessup J. M., van Tuinen P., Ledbetter D. H., Barker D. F., Nakamura Y., White R., Vogelstein B. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. *Science* **244**, 217-221.
- Baker S. J., Markowitz S., Fearon E. R., Willson J. K., Vogelstein B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**, 912-915.
- Bannister A. J., Kouzarides T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643.
- Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M. (1993). Mdm-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J.* **12**, 461-468.
- Barbeau D., Charbonneau R., Whalen S. G., Bayley S. T., Branton P. E. (1994). Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* **9**, 359-373.
- Bargonetti J., Friedman P. N., Kern S. E., Vogelstein B., Prives C. (1991). Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* **65**, 1083-1091.

- Bargonetti J., Reynisdóttir I., Friedman P. N., Prives C. (1992). Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev.* **6**, 1886-1898.
- Barker D. D., Berk A. J. (1987). Adenovirus proteins from both E1b reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* **156**, 107-121.
- Barlev N. A., Liu L., Chehab N. H., Mansfield K., Harris K. G., Halazonetis T. D., Berger S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol. Cell* **8**, 1243-1254.
- Benko M., Kovacs G. M., Lapatra S. E. (2002). Genomic analysis of fish adenovirus isolated from white sturgeon implies a new, fifth adenovirus genus. 'The World of Microbes', 12th Intl. Congress of Virology, Paris 2002.
- Bernards R., Schrier P. I., Houveling A., Bos J. L., van der Eb A. J., Zijlstra M., Melief C. J. (1983a). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**, 776-779.
- Bernards R., Schrier P. I., Bos J. L., van der Eb A. J. (1983b). Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology* **127**, 45-53.
- Bernards R., deLeeuw M. G., Houveling A., van der Eb A. J. (1986). Role of the adenovirus early region 1B tumor antigens in transformation and lytic infection. *Virology* **150**, 126-139.
- Bett A. J., Krougliak V., Graham F. L. (1995). DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res.* **39**, 75-82.
- Bian J., Sun Y. (1997). p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding site: a third member of the p53 family? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14753-14758.
- Bischoff F. Z., Strong L. C., Yim S. O., Pratt D. R., Siliciano M. J., Giovannella B. C., Tainsky M. A. (1991). Tumorigenic transformation of spontaneously immortalized fibroblasts from patients with a familial cancer syndrome. *Oncogene* **6**, 183-186.
- Bischoff J. R., Kirn D. H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J. A., Sampson-Johannes A., Fattaey A., McCormick F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**, 373-376.
- Blair Zajdel M. E., Blair G. E. (1988). The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* **2**, 579-584.
- Boisvert F. M., Hendzel M. J., Bazett-Jones D. P. (2000). Promyelocytic Leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J. Cell Biol.* **148**, 283-292.
- Bond J. A., Wyllie F. S., Wynford-Thomas D. (1994). Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* **9**, 1885-1889.
- Borden K. L., Martin S. R., O'Reilly N., Lally J. M., Reddy B. A., Etkin L. D., Freemont P. S. (1993). Characterisation of a novel cysteine/histidine-rich metal binding domain from Xenopus nuclear factor XNF7. *FEBS Lett.* **335**, 255-260.
- Borden K. L., Boddy M. N., Lally J., O'Reilly N. J., Martin S., Howe K., Solomon E., Freemont P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytis leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO J.* **14**, 1532-1541.
- Borden K. L., Campbell-Dwyer E. J., Salvato M. S. (1998). An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J. Virol.* **72**, 758-766.

- Bos J. L., Polder L. J., Bernards R., Schrier P. I., van den Elsen P. J., van der Eb A. J., van Ormondt H. (1981). The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* **27**, 121-131.
- Bottger A., Bottger V., Garcia-Echeverria C., Chene P., Hochkeppel H. K., Sampson W., Ang K., Howard S. F., Picksley S. M., Lane D. P. (1997). Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J. Mol. Biol.* **269**, 744-756.
- Boyer J., Rohleder K., Ketner G. (1999). Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology* **263**, 307-312.
- Braithwaite A., Nelson C., Skulimowski A., McGovern J., Pigott D., Jenkins J. (1990). Transactivation of the p53 oncogene by E1a gene products. *Virology* **177**, 595-605.
- Braithwaite A. W., Blair G. E., Nelson C. C., McGovern J., Bellett A. J. (1991). Adenovirus E1b-58 kD antigen binds to p53 during infection of rodent cells: evidence for an N-terminal binding site on p53. *Oncogene* **6**, 781-787.
- Brehm A., Kouzarides T. (1999). Retinoblastoma protein meets chromatin. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 142-145.
- Bridge E., Ketner G. (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J. Virol.* **63**, 631-638.
- Bridge E., Ketner G. (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**, 345-353.
- Brown D. R., Thomas C. A., Deb S. P. (1998). The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *EMBO J.* **17**, 2513-2525.
- Brown C. E., Howe L., Sousa K., Alley S. C., Carrozza M. J., Tan S., Workman J. L. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292**, 2333-2337.
- Brownell J. E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmonson D. G., Roth S. Y., Allis C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- Bulavin D. V., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. (1999). Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells. *Oncogene* **18**, 5611-5619.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J. P., Sedivy J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G₂ arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.
- Burgert H. G., Blusch J. H. (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**, 13-25.
- Buschmann T., Fuchs S. Y., Lee C. G., Pan Z. Q., Ronai Z. (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* **101**, 753-762.
- Caelles C., Heimberg A., Karin M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of p53-target genes. *Nature* **370**, 220-223.

- Carlin C. R., Tolfeson A. E., Brady H. A., Hoffman B. L., Wold W. S. (1989). Epidermal growth factor receptor is down-regulated by a 10,400 MW protein encoded by the E3 region of adenovirus. *Cell* **57**, 135-144.
- Carvalho T., Seeler J. S., Ohman K., Jordan P., Pettersson U., Akusjarvi G., Carmo-Fonseca M., Dejean A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell. Biol.* **131**, 45-56.
- Ceballos E., Delgado M. D., Gutierrez P., Richard C., Müller D., Eilers M., Ehinger M., Gullberg U., León J. (2000). c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21^{WAF1} transactivation in K562 leukemia cells. *Oncogene* **19**, 2194-2204.
- Chakravarti D., Ogryzko V., Kao H. Y., Nash A., Chen H., Nakatani Y., Evans R. M. (1999). A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**, 393-403.
- Chattopadhyay D., Ghosh M. K., Mal A., Harter M. L. (2001). Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J. Virol.* **75**, 9844-9856.
- Chelbi-Alix M. K., Quignon F., Pelicano L., Koken M. H., de Thé H. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J. Virol.* **72**, 1043-1051.
- Chelbi-Alix M. K., de Thé H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* **18**, 935-941.
- Chen M. J., Holskin B., Strickler J., Gorniak J., Clark M. A., Johnson P. J., Mitcho M., Shalloway D. (1987). Induction by E1A oncogene expression of cellular susceptibility to lysis by TNF. *Nature* **330**, 581-583.
- Chen J., Marechal V., Levine A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4107-4114.
- Chen P., Tian J., Kovesdi I., Bruder J. B. (1998). Interaction of the adenovirus 14.7k protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 5815-5820.
- Chene P. (1999). p53 mutants without a functional tetramerization domain are not oncogenic. *J. Mol. Biol.* **281**, 205-209.
- Cheng M., Olivier P., Diehl J. A., Fero M., Roussel M. F., Roberts J. M., Sherr C. J. (1999). The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* **18**, 1571-1583.
- Chinnadurai G. (1983). Adenovirus 2 lp+ locus codes for a 19 kd tumor antigen that plays an essential role in cell transformation. *Cell* **33**, 759-766.
- Chiou S. K., Tseng C. C., Rao L., White E. (1994). Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J. Virol.* **68**, 6553-6566.
- Chiou S. K., White E. (1997). p300 binding by E1A cosegregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J. Virol.* **71**, 3515-3525.
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346-355.
- Cladaras C., Wold W. S. (1985a). DNA sequence of the early E3 transcription unit of adenovirus 5. *Virology* **140**, 28-43.
- Cladaras C., Bhat B. M., Wold W. S. (1985). Mapping the 5'ends, 3'ends, and splice sites of mRNAs from the E3 transcription unit of adenovirus 5. *Virology* **140**, 44-54.

Clemens M. J., Laing K. G., Jeffrey I. W., Schofield A., Sharp T. V., Elia A., Matys V., James M. C., Tilleray V. J. (1994). Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie* **76**, 770-778.

Cook J. L., Lewis Jr. A. M., Kirkpatrick C. H. (1979). Age-related and thymus-dependent rejection of adenovirus 2-transformed cell tumors in the Syrian hamster. *Cancer Res.* **39**, 3335-3340.

Cook J. L., Lewis Jr. A. M. (1984). Differential NK cell and macrophage killing of hamster cells infected with nononcogenic or oncogenic adenovirus. *Science* **224**, 612-615.

Cook J. L., Walker T. A., Lewis Jr. A. M., Ruley H. E., Graham F. L., Pilder S. (1986). Expression of the adenovirus E1A oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by host inflammatory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**, 6965-6969.

Cuconati A., Degenhardt K., Sundararayan R., Ansel A., White E. (2002). Bak and bax function to limit adenovirus replication through apoptosis induction. *J. Virol.* **76**, 4547-4558.

Cutt J. R., Shenk T., Hearing P. (1987). Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J. Virol.* **61**, 543-552.

Davison T. S., Vagner C., Kaghad M., Ayed A., Caput D., Arrowsmith C. P. (1999). p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J. Biol. Chem.* **274**, 18709-18714.

Davison A. J., Benko M., Harrach B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* **84**, 2895-2908.

Debbas M., White E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**, 546-554.

Delavaine L., La Thangue N. B. (1999). Control of E2F activity by p21^{Waf1/Cip1}. *Oncogene* **18**, 5381-5392.

Deleu L., Shellard S., Alevizopoulos K., Amati B., Land H. (2001). Recruitment of TRRAP required for oncogenic transformation by E1A. *Oncogene* **20**, 8270-8275.

Delphin C., Cahen P., Lawrence J. J., Baudier J. (1994). Characterization of baculovirus recombinant wild-type p53: Dimerization of p53 is required for high-affinity DNA binding and cysteine oxidation inhibits p53 DNA binding. *Eur. J. Biochem.* **223**, 683-692.

Deryckere F., Burgert H. G. (1996). Tumor necrosis factor α induces the adenovirus early 3 promoter by activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **271**, 30249-30255.

De Thé H., Lavau C., Marchio A., Chomienne C., Degos L., Dejean A. (1991). The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684.

Dhein J., Daniel P. T., Trauth B. C., Oehm A., Möller P. (1992). Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* **149**, 3166-3173.

Di Como C. J., Gaiddon C., Prives C. (1999). p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1438-1449.

Diehl J. A., Cheng M., Roussel M. F., Sherr C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**: 192-229.

- Ding H. F., Lin Y. L., McGill G., Juo P., Zhu H., Blenis J., Yuan J., Fisher D. E. (2000). Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 38905-38911.
- Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A. K., Moore M., Finlay C., Levine A. J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nature Genet.* **4**, 42-46.
- Dix B. R., Edwards S. J., Braithwaite A. W. (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J. Virol.* **75**, 5443-5447.
- Dobbelstein M., Roth J., Kimberly W. T., Levine A. J., Shenk T. (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* **16**, 4276-4284.
- Dobner T., Horikoshi N., Rubenwolf S., Shenk T. (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**, 1470-1473.
- Doucas V., Ishov A. M., Romo A., Juguilon H., Weitzman M. D., Evans R. M., Maul G. G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**, 196-207.
- Doucas V., Tini M., Egan D. A., Evans R. M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2627-2632.
- Dürst M., Dzarlieva-Petrusevska R. T., Boukamp P., Fusenig N. E., Gissmann L. (1987). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256.
- Dyck J. A., Maul G. G., Miller Jr. W. H., Chen D., Kakizuka A., Evans R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**, 333-343.
- Dyson N., Howley P. M., Munger K., Harlow E. (1989). The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937.
- Edwards S. J., Dix B. R., Myers C. J., Dobson-Le D., Huschtscha L., Hibma M., Royds J., Braithwaite A. W. (2002). Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14^{ARF} tumor suppressor genes. *J. Virol.* **76**, 12483-12490.
- El-Deiry W. S., Kern S. E., Pietenpol J. A., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. genet.* **1**, 45-49.
- El-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
- Eliyahu D., Michalovitz D., Oren M. (1985). Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* **316**, 158-160.
- Elsing A., Burgert H. G. (1998). The adenovirus E3/10.4k-14.5k proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10072-10077.
- Ensinger M. J., Ginsberg H. S. (1972). Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus. *J. Virol.* **10**, 328-339.
- Espinosa J. M., Emerson B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol. Cell* **8**, 57-69.

- Esteller M., Cordon-Cardo C., Corn P. G., Meltzer S. J., Pohar K. S., Watkins D. N., Capella G., Peinado M. A., Matias-Guiu X., Prat J., Baylin S. B., Herman J. G. (2001). p14ARF silencing by promotor hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res.* **61**, 2816-2821.
- Everett R. D., Maul G. G. (1994). HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J.* **13**, 5062-5069.
- Fallaux F. J., Kranenburg O., Cramer S. J., Houweling A., Van Ormondt H., Hoebe R. C., van der Eb A. J. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Human Gene Ther.* **7**, 215-22.
- Fang S., Jensen J. P., Ludwig R. L., Vousden K. H., Weissman A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 8945-8951.
- Farrow S. N., White J. H., Martinou I., Raven T., Pun K. T., Grinham C. J., Martinou J. C., Brown R. (1995). Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* **374**, 731-733.
- Fattaey A. R., Harlow E., Helin K. (1993). Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7267-7277.
- Fearon E. R., Hamilton S. R., Vogelstein B. (1987). Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* **238**, 193-197.
- Fields S., Jang S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**, 1046-1049.
- Fillippovich I., Sorokina N., Gatei M., Haupt Y., Hobson K., Moallem E., Spring K., Mould M., McGuckin M. A., Lavin M. F., Khanna K. K. (2001). Transactivation-deficient p73alpha (p73deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* **20**, 514-522.
- Finlay C. A., Hinds P. W., Tan T. H., Eliyahu D., Oren M. et al., (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 531-539.
- Flenghi L., Fagioli M., Tommassoni L., Pileri S., Gambacorta M., Pacini R., Grignani F., Casini T., Ferrucci P. F., Martelli M. F., Pellici P. G. (1995). Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood* **85**, 1871-1880.
- Freedman, D. A., Epstein C. B., Roth J. C., Levine A. J. (1997). A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol. Med.* **3**, 248-259.
- Freemont P. S., Hanson I. M., Trowsdale J. (1991). A novel cystein-rich sequence motif. *Cell* **64**, 483-484.
- Friedman P. N., Chen X., Bargonetti J., Prives C. (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3319-3323.
- Fuchs M., Gerber J., Drapkin R., Sif S., Ikura T., Ogryzko V., Lane W. S., Nakatani Y., Livingston D. M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**, 297-307.
- Funk W. D., Pak D. T., Karas R. H., Wright W. E., Shay J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2866-2871.

Gaiddon C., Lokshin M., Ahn J., Zhang T., Prives C. (2001). A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1874-1887.

Gallimore P. H., Sharp P. A., Sambrook J. (1974). Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in 9 cell lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J. Mol. Biol.* **89**, 49-72.

Ganly I., Kirn D., Eckhardt S. G., Rodriguez G. I., Soutar D. S., Otto R., Robertson A. G., Park O., Gulley M. L., Heise C., von Hoff D. D., Kaye S. B. (2000). A phase I study of ONYX-015, an E1B-attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **6**, 798-806.

Ganly I., Kim Y. T., Hann B., Balmain A., Brown R. (2001). Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumor cells is associated with reduced apoptosis. *Gene Ther.* **8**, 369-375.

Goddard A. D., Borrow J., Freemont P. S., Solomon E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* **254**, 1371-1374.

Gooding L. R., Elmore L. W., Tollefson A. E., Brady H. A., Wold W. S. (1988). A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341-346.

Gooding L. R., Sofola I. O., Tollefson A. E., Duerksen-Hughes P., Wold W. S. (1990). The adenovirus E3-14.7k protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis. *J. Immunol.* **145**, 3080-3086.

Gooding L. R., Aquino L., Duerksen-Hughes P. J., Day D., Horton T. M., Yei S., Wold W. S. (1991). The E1B-19k protein of group C adenoviruses prevents cytolysis by tumor necrosis factor of human cells but not mouse cells. *J. Virol.* **65**, 3083-3094.

Goodrum F. D., Ornelles D. A. (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.* **72**, 9479-9490.

Gorospe M., Cirielli C., Wang X., Seth P., Capogrossi M. C., Holbrook N. J. (1997). p21 (Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* **14**, 929-935.

Graham F. L., van der Eb A. J., Heijneker H. L. (1974). Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* **251**, 687-691.

Graham F. L., Smiley J., Russel W. C., Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-72.

Grand R. J., Lecane P. S., Roberts S., Grant M. L., Lane D. P., Young L. S., Dawson C. W., Gallimore P. H. (1993). Overexpression of wild-type p53 and c-myc in human fetal cells transformed with adenovirus early region 1. *Virology* **193**, 579-591.

Grand R. J., Grant M. L., Gallimore P. H. (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**, 229-240.

Grand R. J., Lecane P. S., Owen D., Grant M. L., Roberts S., Levine A. J., Gallimore P. H. (1995). The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression. *Virology* **210**, 323-334.

Grand R. J., Parkhill J., Szeszak T., Rookes S. M., Roberts S., Gallimore P. H. (1999). Definition of a major p53 binding site on Ad2E1B58K protein and a possible nuclear localization signal on the Ad12E1B54K protein. *Oncogene* **18**, 955-965.

Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M., Harris C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4855-4878.

Grignani F., Ferrucci P. F., Testa U., Talamo G., Fagioli M., Alcaly M., Mencarelli A., Grignani F., Peschle C., Nicoletti I., Pelicci P. G. (1993). The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR α fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell* **74**, 423-431.

Grob T. J., Novak U., Maisse C., Barcaroli D., Luthi A. U., Pirnia F., Hugli B., Graber H. U., De Laurenzi V., Fey M. F., Melino G., Tobler A. (2001). Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ.* **8**, 1213-1223.

Grossman S. R., Deato M. E., Brignone C., Chan H. M., Kung A. L., Tagami H., Nakatani Y., Livingston D. M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* **300**, 342-344.

Gu W., Roeder R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.

Gualberto A., Aldape K., Kozakiewicz K., Tlsty T. D. (1998). An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5166-5171.

Habib N. A., Sarraf C. E., Mitry R. R., Havlik R., Nicholls J., Kelly M., Vernon C. C., Gueret-Wardle D., El-Masry R., Salama H., Ahmed R., Michail N., Edward E., Jensen S. L. (2001). E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 219-226.

Halazonetis T. D., Kandil A. N. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerisation domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J.* **12**, 5057-5064.

Halbert D. N., Spector D. J., Raskas H. J. (1979). In vitro translation products specified by the transforming region of adenovirus type 2. *J. Virol.* **31**, 621-629.

Hall M., Bates S., Peters G. (1995). Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* **11**, 1581-1588.

Han J., Sabbatini P., Perez D., Rao L., Modha D., White E. (1996). The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* **10**, 461-477.

Harada J. N., Berk A. J. (1999). p53-independent and -dependent requirements for E1B-55k in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* **73**, 5333-5344.

Harada J. N., Shevchenko A., Shevchenko A., Pallas D. C., Berk A. J. (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* **76**, 9194-9206.

Harrison T., Graham F., Williams J. (1977). Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. *Virology* **77**, 319-329.

Harrod R., Nasca J., van Lint C., Hansen J., Karpova T., Mc Nally J., Franchini G. (2003). Human immunodeficiency virus type-1 Tat/co-activator acetyltransferase interactions inhibit p53Lys-320 acetylation and p53-responsive transcription. *J. Biol. Chem.* **278**, 12310-12318.

Harvey D. M., Levine A. J. (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* **5**, 2375-2385.

- Harvey M., Vogel H., Morris D., Bradley A., Bernstein A., Donehower L. A. (1995). A mutant p53 transgene accelerates tumor development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet.* **9**, 305-311.
- Hasegawa J., Kamada S., Kamiike W., Shimizu S., Imazu T., Matsuda H., Tsujimoto Y. (1996). Involvement of CPP32/Yama(-like) proteases in Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **56**, 1713-1718.
- Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K. H., Oren M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by transactivation-deficient p53. *Genes Dev.* **9**, 2170-2183.
- Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Kazaz A., Vousden K., Oren M. (1997a). p53-mediated apoptosis in HeLa cells: transcription dependent and independent mechanisms. *Leukemia* **11**, 337-339.
- Haupt Y., Maya R., Kazaz A., Oren M. (1997b). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.
- He T. C., Zhou S., da Costa L. T., Yu J., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2509-2514.
- Hecht R., et al. (2000). A phase I/II trial of intratumoral endoscopic injection of Onyx-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 1039.
- Heise C., Sampson-Johannes A., Williams A. McCormick F., von Hoff D. D., Kirn D. H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* **3**, 639-645.
- Heise C., Ganly I., Kim Y. T., Sampson-Johannes A., Brown R., Kirn D. (2000a). Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomas is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status. *Gene Ther.* **7**, 1925-1929.
- Heise C., Lemmon M., Kirn D. (2000b). Efficacy with replication selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4908-4914.
- Heisterkamp N., Stephenson J. R., Groffen J., Hansen P. F., de Klein A., Bartram C. R., Grosveld G. (1983). Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 239-242.
- Herskovitz I. (1987). Functional interaction of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**, 212-222.
- Ho Y. S., Galos R., Williams J. F. (1982). Isolation of type 5 adenovirus mutants with a cold-sensitive phenotype: Genetic evidence of an adenovirus transformation maintenance function. *Virology* **122**, 109-124.
- Hoffmann P., Carlin C. (1994). Adenovirus E3 protein causes constitutively internalized epidermal growth factor receptors to accumulate in a prelysosomal compartment, resulting in enhanced degradation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3695-3706.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C. C. (1991). p53 mutation in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
- Hollstein M., Shimer B., Greenblatt M., Soussi T., Hovig E., Harris C. C., Montesano R. (1996). Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucl. Acid Res.* **24**, 141-146.

- Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25-27.
- Honda R., Yasuda H. (1999). Association of p19^{ARF} with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* **18**, 22-27.
- Howe J. A., Mymryk J. S., Egan C., Branton P. E., Bayley S. T. (1990). Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5883-5887.
- Huang D. C., Cory S., Strasser A. (1997). Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B19kD are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* **14**, 405-414.
- Huang M. M., Hearing P. (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J. Virol.* **63**, 2605-2615.
- Ishov A. M., Sotnikov A. G., Negorev D., Vladimirova O. V., Neff N., Kamitani T., Yeh E. T., Strauss III J. F., Maul G. G. (1999). Pml is critical for ND10 formation and recruits the Pml-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* **147**, 221-233.
- Ito A., Lai C. H., Zhao X., Saito S., Hamilton M. H., Appella E., Yao T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J.* **20**, 1331-1340.
- Jenkins J. R., Rudge K., Currie G. A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation associated phosphoprotein p53. *Nature* **312**, 651-654.
- Jeffrey P. D., Gorina S., Pavletich N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 Angstroms. *Science* **267**, 1498-1502.
- Johnson D. G., Schwarz J. K., Cress W. D., Nevins J. R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352.
- Jones N., Shenk T. (1978). Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell* **13**, 181-188.
- Jones N., Shenk T. (1979a). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**, 683-689.
- Jones N., Shenk T. (1979b). An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3665-3669.
- Jost C. A., Marin M. C., Kaelin Jr. W. G. (1997). p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389**, 191-194.
- Ju S. T., Panka D. J., Cui H., Ettinger R., el-Khatib M., Sherr D. H., Stanger B. Z., Marshak-Rothstein A. (1995). Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* **373**, 444-448.
- Juan L. J., Shia W. J., Chen M. H., Yang W. M., Seto E., Lin Y. S., Wu C. W. (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 20436-20443.
- Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J. C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J. M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F., Caput D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a human region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-819.

- Kakuzika A., Miller Jr. W. H., Umesono K., Warrell Jr. R. P., Frankel S. R., Murty V. V., Dimitrovsky E., Evans R. M. (1991). Chromosomal translocation t (15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**, 663-674.
- Kamijo T., Weber J. D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M. F., Sherr C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8292-8297.
- Kamps M. P., Murre C., Sun X. H., Baltimore D. (1990). A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**, 547-555.
- Kao C. C., Yew P. R., Berk A. J. (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55k proteins. *Virology* **179**, 806-814.
- Kartasheva N. N., Contente A., Lenz-Stöppler C., Roth J., Dobbelsstein M. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73ΔN, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* **21**, 4715-4727.
- Kast W. M., Offringa R., Peters P. J., Voordouw A. C., Meloen R. H., van der Eb A. J., Melief C. J. (1989). Eradication of adenovirus E1-induced tumors by E1A-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **59**, 603-614.
- Kastan M. B., Zhan Q., El-Deiry W. S., Carrier F., Jacks T., Walsh W. V., Plunkett B. S., Vogelstein B. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597.
- Kastner P., Perez A., Lutz Y., Rochette-Egly C., Gaub M. P., Durand B., Lanotte M., Berger R., Chambon P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor α fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J.* **11**, 629-642.
- Keblusek P., Dorsman J. C., Teunisse A. F., Teunissen H., van der Eb A. J., Zanema A. (1999). The adenoviral E1A oncoproteins interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21^{CIP1/WAF1}. *J. Gen. Virol.* **80**, 381-390.
- Kelly C., van Driel R., Wilkonson G. W. (1995). Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* **76**, 2887-2893.
- Kern S. E., Kinzler K. W., Bruskin A., Jarosz D., Friedman P., Prives C., Vogelstein B. (1991). Identification of p53 as a sequence specific DNA binding protein. *Science* **252**, 1707-1711.
- Kern S. E., Pietsenpol J. A., Thiagalingam S., Seymour A., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* **256**, 827-830.
- Khanna K. K., Keating K. E., Kozlov S., Scott S., Gatei M., Hobson K., Taya Y., Gabrielli B., Chan D., Lees-Miller S. P., Lavin M. F. (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.* **20**, 398-400.
- Khosravi R., Maya R., Gottlieb T., Oren M., Shiloh Y., Shkedy D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14973-14977.
- Khuri F. R., Nemunaitis J., Ganly I., Arseneau J., Tannock I. F., Romel L., Gore M., Ironside J., MacDougall R. H., Heise C., Randlev B., Gillenwater A. M., Bruso P., Kaye S. B., Hong W. K., Kirn D. H. (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* **6**, 879-885.

- Kirn D., Hermiston T., McCormick F. (1998). ONYX-015: clinical data are encouraging. *Nat. Med.* **4**, 1341-1342.
- Kim J., Cho J. Y., Kim J. H., Jung K. C., Yun C. O. (2002). Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **9**, 725-736.
- Kluck R. M., Bossy-Wetzel E., Green D. R., Newmeyer D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Koch P., Gatfield J., Löber C., Hobom U., Lenz-Stöppler C., Roth J., Dobbelstein M. (2001). Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res.* **61**, 5941-5947.
- Koken M. H., Puvion D. F., Guillemain M. C., Viron A., Linares-Cruz G., Stuurman N., De Jong L., Szosteki C., Calvo F., Chomienne C., Degos L., Puvion H., de Thé H. (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J.* **13**, 1073-1083.
- Koken M. H., Linares-Cruz G., Quignon F., Viron A., Chelbi-Alix M. K., Sobczak-Thépot J., Juhlin L., Degos L., Calvo F., de Thé H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* **10**, 1315-1324.
- König C., Roth J., Dobbelstein M. (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J. Virol.* **73**, 2253-2262.
- Koriath F., Maul G. G., Plachter B., Stamminger T., Frey J. (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp. Cell Res.* **229**, 155-158.
- Kubbutat M. H., Jones S. N., Vousden K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kubbutat M. H., Ludwig R. L., Ashcroft M., Vousden K. H. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5690-5698.
- Kussie P. H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A. J., Pavletich N. P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-953.
- LaBaer J., Garrett M. D., Stevenson L. F., Slingerland J. M., Sandhu C., Chou H. S., Fattaey A., Harlow E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* **11**, 847-862.
- Lamont J. P., Nemunaitis J., Kuhn J. A., Landers S. A., McCarty T. M. (2000). A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Ann. Surg. Oncol.* **7**, 588-592.
- La Morte V. J., Dyck J. A., Ochs R. L., Evans R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4991-4996.
- Lane D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Lavau C., Marchio A., Fagioli M., Jansen J., Falini B., Lebon P., Grosveld F., Pandolfi P. P., Pelicci P. G., Dejean A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* **11**, 871-876.
- Lee C. W., Sorensen T. S., Shikama N., La Thangue N. B. (1998). Functional interplay between p53 and E2F through co-activator p300. *Oncogene* **16**, 2695-2710.

- Lee M., Draoui M., Zia F., Gazdar A., Oie H., Bepler G., Bellot F., Tarr C., Kris R., Moody T. W. (1992). Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies inhibit the growth of lung cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **13**, 117-123.
- Leppard K. N., Shenk T. (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* **8**, 2329-2336.
- Levine A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Li H., Leo C., Zhu J., Wu X., O'Neil J., Park E. J., Chen J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1784-1796.
- Li M., Luo J., Brooks C. L., Gu W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**, 50607-50611.
- Lianes P., Orlow I., Zhang Z. F., Oliva M. R., Sarkis A. S., Reuter V. E., Cordon-Cardo C. (1994). Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 1325-1330.
- Lill N. L., Tevethia M. J., Eckner R., Livingston D. M., Modjtahedi N. (1997a). p300 family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *J. Virol.* **71**, 129-137.
- Lill N. L., Grossmann S. R., Ginsberg D., DeCaprio J., Livingston D. M. (1997b). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**, 823-827.
- Lin J., Chen J., Elenbaas B., Levine A. J. (1994). Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* **8**, 1235-1246.
- Linke S. P., Sengupta S., Khabie N., Jeffries B. A., Buchhop S., Miska S., Henning W., Pedoux R., Wang X. W., Hofseth L. J., Yang Q., Garfield S. H., Sturzbecher H. W., Harris C. C. (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res.* **63**, 2596-2605.
- Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D., Berger S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1202-1209.
- Liu X., Kim C. N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.
- Liu Y., Colosimo A. L., Yang X. J., Liao D. (2000). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5540-5553.
- Löber C., Lenz-Stöppler C., Döbelstein M. (2002). Adenovirus E1-transformed cells grow despite the continuous presence of transcriptionally active p53. *J. Gen. Virol.* **83**, 2047-2057.
- Lowe S. W., Ruley H. E. (1993a). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* **7**, 535-545.
- Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A., Jacks T. (1993b). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**, 847-849.
- Luo J., Su F., Chen D., Shiloh A., Gu W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377-381.
- Mayhar-Roemer M., Roemer K. (2001). p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* **20**, 3387-3398.

- Marchenko N. D., Zaika A., Moll U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 16202-16212.
- Marin M. C., Jost C. A., Irwin M. S., DeCaprio J. A., Caput D., Kaelin Jr. W. G. (1998). Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6316-6324.
- Marin M. C., Jost C. A., Brooks L. A., Irwin M. S., O'Nions J., Tidy J. A., James N., McGregor J. M., Harwood C. A., Yulug I. G., Vousden K. H., Allday M. J., Gusterson B., Ikawa S., Hinds P. W., Crook T., Kaelin Jr. W. G. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* **25**, 47-54.
- Marston N. J., Jenkins J. R., Vousden K. H. (1995). Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6. *Oncogene* **10**, 1709-1715.
- Marton M. J., Baim S. B., Ornelles D. A., Shenk T. (1990). The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J. Virol.* **64**, 2345-2359.
- Mattern M. R., Mong S. M., Bartus H. F., Mirabelli C. K., Crooke S. T., Johnson R. K. (1987). Relationship between the intracellular effects of camptothecin and the inhibition of DNA topoisomerase I in cultured L1210 cells. *Cancer Res.* **47**, 1793-1798.
- Maul G. G., Everett R. D. (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J. Gen. Virol.* **75**, 1223-1233.
- Mayo L. D., Turchi J. J., Berberich S. J. (1997). Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res.* **57**, 5013-5016.
- McLure K. G., Lee P. W. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J.* **17**, 3342-3350.
- Meek D. W., Simon S., Kikkawa U., Eckhart W. (1990). The p53 tumor suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II. *EMBO J.* **9**, 3253-3260.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577-590.
- Milner J., Metcalf E. A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild-type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765-774.
- Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C., George D., Levine A. J. (1992). The *mdm-2* oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245.
- Momand J., Wu H. H., Dasgupta G. (2000). MDM2 - master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29.
- Moore M., Horikoshi N., Shenk T. (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11295-11301.
- Moran E., Matthews B. (1987). Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. *Cell* **48**, 177-178.
- Mowat M., Cheng A., Kimura N., Bernstein A., Benchimol S. (1985). Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* **314**, 633-636.
- Mu Z. M., Chin K. V., Liu J. H., Lozano G., Chang K. S. (1994). PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6858-6867.

Müller S., Matunis M., Dejean A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* **17**, 61-70.

Murphy M., Ahn J., Walker K. K., Hoffman W. H., Evans R. M., Levine A. J., George D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* **13**, 2490-2501.

Nagata S., Goldstein P. (1995). The fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.

Nemunaitis J., Ganly I., Khuri F., Arseneau J., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Maples P., Romel L., Randlev B., Reid T., Kaye S., Kirn D. (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res.* **60**, 6359-6366.

Nevels M., Rubenwolf S., Spruss T., Wolf H., Dobner T. (1997). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1206-1211.

Nevels M., Täuber B., Kremmer E., Spruss T., Wolf H., Dobner T. (1999). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* **73**, 1591-1600.

Nigro J. M., Baker S. J., Preisinger A. C., Jessup J. M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S. H., Davidson N., Baylin S., Devilee P. et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* **342**, 705-708.

Nourse J., Mellentin J. D., Galili N., Wilkinson J., Stanbridge E., Smith S. D., Cleary M. L. (1990). Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**, 535-545.

Obert S., O'Connor R. J., Schmid S., Hearing P. (1994). The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1333-1346.

Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H., Nakatani Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**, 953-959.

Oliner J. D., Kinzler K. W., Meltzer P. S., George D. L., Vogelstein B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83.

O'Reilly D. R., Miller L. K. (1988). Expression and complex formation of simian virus 40 large antigen and mouse p53 in insect cells. *J. Virol.* **62**, 3109-3119.

Oren M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* **10**, 431-442.

Orlinick J. R., Chao M. V. (1998). TNF-related ligands and their receptors. *Cell Signal.* **10**, 543-551.

Pandolfi P. P., Grignani F., Alcaly M., Mencarelli A., Biondi A., Lo Coco F., Grignani F., Pelicci P. G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR α cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* **6**, 1285-1292.

Pavletich N. P., Chambers K. A., Pabo C. O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* **7**, 2556-2564.

Pearson M., Carbone R., Sebastiani C., Cioce M., Fagioli M., Saito S., Higashimoto Y., Appella E., Minucci S., Pandolfi P. P., Pelicci P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-210.

- Perez A., Kastner P., Sethi S., Lutz Y., Reibel C., Chambon P. (1993). PMLRAR homodimers, distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. *EMBO J.* **12**, 3171-3182.
- Perez D., White E. (1998). E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through Fadd-dependent sequestration of FLICE. *J. Cell Biol.* **141**, 1255-1266.
- Perez D., White E. (2000). TNF- α signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in bax that is inhibited by E1B 19K. *Mol. Cell* **6**, 53-63.
- Perez D., White E. (2003). E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha by downregulating c-FLIP S. *J. Virol.* **77**, 2651-2662.
- Phelps W. C., Yee C. L., Munger K., Howley P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**, 539-547.
- Pietenpol J. A., Tokino T., Thiagalingam S., El-Deiry W. S., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1998-2002.
- Pilder S., Logan J., Shenk T. (1984). Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1b 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J. Virol.* **52**, 664-671.
- Pilder S., Moore M., Logan J., Shenk T. (1986a). The adenovirus E1B-55k transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 470-476.
- Pilder S., Leppard K., Logan J., Shenk T. (1986b). Functional analysis of the adenovirus E1B 55K polypeptide. *Cancer Cells* **4**, 285-290.
- Pommerantz J., Schreiber-Agus N., Liégeois N. J., Silverman A., Alland L., Chin L., Potes J., Chen K., Orlow I., Lee H. W., Cordon-Cardo C., DePinho R. A. (1998). The *ink4a* tumor suppressor gene product, p19^{arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723.
- Prives C., Hall P. A. (1999). The p53 pathway. *J. Pathol.* **187**, 112-126.
- Quelle D. E., Zindy F., Ashmun R. A., Sherr C. J. (1995). Alternative reading frames of the *INK4a* tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000.
- Querido E., Marcellus R. C., Lai A., Charbonneau R., Teodoro J. G., Ketner G., Branton P. E. (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 3788-3798.
- Querido E., Blanchette P., Yan Q., Kamura T., Morrison M., Boivin D., Kaelin W. G., Conaway R. C., Conaway J. W., Branton P. E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* **15**, 3104-3117.
- Quignou F., De Bels F., Koken M., Feunteun J., Ameisen J. C., de Thé H. (1998). PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat. genet.* **20**, 259-265.
- Ralston R. (1991). Complementation of transforming domains in E1a/myc chimeras. *Nature* **353**, 866-868.
- Rao L., Debbas M., Sabbatini P., Hockenbery D., Korsmeyer S., White E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7742-7746.

- Raycroft L., Wu H., Lozano G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* **249**, 1049-1051.
- Regula K. M., Kirshenbaum L. A. (2001). p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 1435-1445.
- Reich N. C., Sarnow P., Duprey E., Levine A. J. (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* **128**, 480-484.
- Reid J. L., Bannister A. J., Zegerman P., Martinez-Balbas M. A., Kouzarides T. (1998). E1A directly binds and regulates the PCAF acetyltransferase. *EMBO J.* **17**, 4469-4477.
- Reid T., et al. (2000). Hepatic artery infusion of Onyx-015, a replication-selective adenovirus, in combination with 5-FU/leucovorin for gastrointestinal carcinoma metastatic to the liver: A phase I/II clinical trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 953.
- Ries S. J., Brandts C. H., Chung A. S., Biederer C. H., Hann B. C., Lipner E. M., McCormick F., Korn W. M. (2000). Loss of p14^{ARF} in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat. Med.* **6**, 1128-1133.
- Robertson A. M., Bird C. C., Waddell A. W., Currie A. R. (1978). Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J. Pathol.* **126**, 181-187.
- Roemer K. (1999). Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol. Chem.* **380**, 879-887.
- Rogulski K. R., Freytag S. O., Zhang K., Gilbert J. D., Paielli D. L., Kim J. H., Heise C. C., Kim D. H. (2000). *In vivo* antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and augmented by radiotherapy. *Cancer Res.* **60**, 1193-1196.
- Roth J., König C., Wienzek S., Weigel S., Ristea S., Dobbelstein M. (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J. Virol.* **72**, 8510-8516.
- Rothmann T., Hengstermann A., Whitaker N. J., Scheffner M., zur Hausen H. (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* **72**, 9470-9478.
- Ruley H. E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606.
- Sakaguchi K., Herrera J. E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W., Appella E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* **12**, 2831-2841.
- Sarnow P., Ho Y. S., Williams J., Levine A. J. (1982a). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**, 387-394.
- Sarnow P., Sullivan C. A., Levine A. J. (1982b). A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology* **120**, 510-517.
- Sarnow P., Hearing P., Anderson C. W., Halbert D. N., Shenk T., Levine A. J. (1984). Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* **49**, 692-700.
- Sauthoff H., Heitner S., Rom W. N., Hay J. G. (2000). Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Human Gene Therapy* **11**, 379-388.

- Sayan A. E., Sayan B. S., Findikli N., Ozturk M. (2001). Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 5111-5117.
- Scheffner M., Werness B. A., Huibregtse J. M., Levine A. J., Howley P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.
- Schwarz E., Freese U. K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A., zur Hausen H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114.
- Schrier P. I., Bernards R., Vaessen R. T., Houveling A., van der Eb A. J. (1983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* **305**, 771-775.
- Scolnick D. M., Chehab N. H., Stavridi E. S., Lien M. C., Caruso L., Moran E., Berger S. L., Halazonetis T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* **57**, 3693-3696.
- Seeler J. S., Dejean A. (1999). The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 362-367.
- Selivanova G., Iotsova V., Kiseleva E., Strom M., Bakalkin G., Graftstrom R. C., Wiman K. G. (1996). The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3560-3567.
- Seoane J., Le H. V., Massagué J. (2002). Myc suppression of the $p21^{Cip1}$ Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**, 729-734.
- Sharp T. V., Schwemmle M., Jeffrey I., Laing K., Mellor H., Proud C. G., Hilse K., Clemens M. J. (1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VA1 RNA. *Nucl. Acid Res.* **21**, 4483-4490.
- Shen Y., Kitzes G., Nye J. A., Fattaey A., Hermiston T. (2001). Analysis of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55k protein. *J. Virol.* **75**, 4297-4307.
- Sherr C. J., Roberts J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512.
- Shieh S. Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-334.
- Shieh S. Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y., Prives C. (2000). The human homologs of the checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* **14**, 289-300.
- Shiohara M., Koike K., Komiyama A., Koeffler H. P. (1997). p21 Waf1 mutations and human malignancies. *Leuk. Lymphoma* **26**, 35-41.
- Shisler J., Yang C., Walter B., Ware C. F., Gooding L. R. (1997). The adenovirus E3-10.4k/14.5k complex mediates loss of cell surface fas (CD95) and resistance to fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**, 8299-8306.
- Shiroki K., Ohshima K., Fukui Y., Ariga H. (1986). The adenovirus type 12 early-region 1B 58,000-Mr gene product is required for viral DNA synthesis and for initiation of cell transformation. *J. Virol.* **57**, 792-801.

- Smith R. R., Huebner R. J., Rowe W. P., Schatten W. E., Thomas L. B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* **9**, 1211-1218.
- Somasundaram K., El-Deiry W. S. (1997). Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. *Oncogene* **14**, 1047-1057.
- Srivastava S., Wang S., Tong Y. A., Pirollo K., Chang E. H. (1993). Several mutant p53 proteins detected in cancer prone families with Li-Fraumeni syndrome exhibit transdominant effects on the biochemical properties of wild-type p53. *Oncogene* **8**, 2449-2456.
- Stadler M., Chelbi-Alix M. K., Koken M. H., Venturini L., Lee C., Saïb A., Quignon F., Pelicano L., Guillemin M. C., Schindler C., de Thé H. (1995). Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferon is mediated through an ISRE and GAS element. *Oncogene* **11**, 2565-2573.
- Staufenbiel M., Eppler P., Deppert W. (1986). Progressive reorganization of the host cell cytoskeleton during adenovirus infection. *J. Virol.* **60**, 1186-1191.
- Steegenga W. T., van Laar T., Riteco N., Mandarino A., Shvarts A., van der Eb A. J., Jochemsen A. G. (1996). Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2101-2109.
- Steegenga W. T., Riteco N., Jochemsen A. G., Fallaux F. J., Bos J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* **16**, 349-357.
- Steegenga W. T., Shvarts A., Riteco N., Bos J. L., Jochemsen A. G. (1999a). Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3885-3894.
- Steegenga W. T., Riteco N., Bos J. L. (1999b). Infectivity and expression of the early adenovirus proteins are important regulators of wild-type and Δ E1B adenovirus replication in human cells. *Oncogene* **18**, 5032-5043.
- Stein R. W., Corrigan M., Yaciuk P., Whelan J., Moran E. (1990). Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J. Virol.* **64**, 4421-4427.
- Sternsdorf T., Guldner H. H., Szosteki C., Grotzinger T., Will H. (1995). Two molecular dot associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand. J. Immunol.* **42**, 257-268.
- Sternsdorf T., Jensen K., Will H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC-1/SUMO-1. *J. Cell Biol.* **139**, 1621-1634.
- Stiewe T., Theseling C. C., Pützer B. M. (2002). Transactivation-deficient delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 14177-14185.
- Stott F. J., Bates S., James M. C., McConnell B. B., Starborg M., Brookes S., Palmero I., Ryan K., Hara E., Vousden K. H., Peters G. (1998). The alternative product from the human *CDKN2A* locus, p14^{ARF}, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**, 5001-5014.
- Strano S., Munarriz E., Rossi M., Cristofanelli B., Shaul Y., Castagnoli I., Levine A. J., Sacchi A., Cesareni G., Oren M., Blandino G. (2000). Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 29503-29512.

- Strano S., Fontemaggi G., Costanzo A., Rizzo M. G., Monti O., Baccarini M., Del Sal G., Levrero M., Sacchi A., Oren M., Blandino G. (2002). Physical interaction with human tumor-derived p53 mutant inhibits p63 activities. *J. Biol. Chem.* **277**, 18817-18826.
- Sundararajan R., Cuconati A., Nelson D., White E. (2001). Tumor necrosis factor- α induces bax-bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B-19k. *J. Biol. Chem.* **276**, 45120-45127.
- Teodoro J. G., Branton P. E. (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* **71**, 3620-3627.
- Terris B., Baldin V., Dubois S., Degott C., Flejou J. F., Hénin D., Dejean A. (1995). PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* **55**, 1590-1597.
- Tewari M., Quan L. T., O'Rourke K., Desnoyers S., Zeng Z., Beidler D. R., Poirier G. G., Salvesen G. S., Dixit V. M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.
- Thimmappaya B., Jones N., Shenk T. (1979). A mutation which alters initiation of transcription by RNA polymerase III on the Ad5 chromosome. *Cell* **18**, 947-954.
- Thimmappaya B., Weinberger C., Schneider R. J., Shenk T. (1982). Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* **31**, 543-551.
- Thomas A., White E. (1998). Suppression of the p300-dependent *mdm2* negative-feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev.* **12**, 1975-1985.
- Tibbetts R. S., Brumbaugh K. M., Williams J. M., Sarkaria J. N., Cliby W. A., Shieh S. Y., Taya Y., Prives C., Abraham R. T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* **13**, 152-157.
- Tigges M. A., Raskas H. J. (1984). Splice junctions in adenovirus 2 early region 4 mRNAs: multiple splice sites produce 18 to 24 RNAs. *J. Virol.* **50**, 106-117.
- Tishler R. B., Calderwood S. K., Coleman C. N., Price B. D. (1993). Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. *Cancer Res.* **53**, 2212-2216.
- Tollefson A. E., Wold W. S. (1988). Identification and gene mapping of a 14,700-molecular weight protein encoded by region E3 of group C adenoviruses. *J. Virol.* **62**, 33-39.
- Tollefson A. E., Stewart A. R., Yei S., Saha S. K., Wold W. S. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus form a complex and function together to down-regulate the epidermal growth factor receptor. *J. Virol.* **65**, 3095-3105.
- Tollefson A. E., Scaria A., Hermiston T. W., Ryerse J. S., Wold L. J., Wold W. S. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6k) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from insect cells. *J. Virol.* **70**, 2296-2306.
- Tollefson A. E., Hermiston T. W., Lichtenstein D. L., Colle C. F., Tripp R. A., Dimitrov T., Toth K., Wells C. E., Doherty P. C., Wold W. S. (1998). Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **392**, 726-730.
- Tollefson A. E., Toth K., Doronin K., Kuppuswamy M., Doronina O. A., Lichtenstein D. L., Hermiston T. W., Smith C. A., Wold W. S. (2001). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins. *J. Virol.* **75**, 8875-8887.

- Tom B. H., Rutzky L. P., Jakstys M. M., Oyasu R., Kaye C. I., Kahan B. D. (1976). Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* **12**, 180-191.
- Torok M., Etkin L. D. (2001). Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins. *Differentiation* **67**, 63-71.
- Tsai S., Collins S. J. (1993). A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocyte stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7153-7157.
- Turenne G. A., Paul P., Laflair L., Price B. D. (2001). Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene* **20**, 5100-5110.
- Turnell A. S., Grand R. J., Gallimore P. H. (1999). The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J. Virol.* **73**, 2074-2083.
- Vaessen R. T., Houweling A., Israel A., Kourilsky P., van der Eb A. J. (1986). Adenovirus E1A-mediated regulation of class I MHC expression. *EMBO J.* **5**, 335-341.
- Valian S., Gäken J. A., Gingold E. B., Kouzarides T., Chang K. S., Farzaneh F. (1998). Modulation of Fos-mediated AP-1 transcription by the promyelocytic leukemia protein. *Oncogene* **16**, 2843-2853.
- van den Heuvel S. J., van Laar T., Kast W. M., Melief C. J., Zantema A., van der Eb A. J. (1990). Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55kd proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells. *EMBO J.* **9**, 2621-2629.
- van den Heuvel S. J., van Laar T., The I., van der Eb A. J. (1993). Large E1B proteins of adenovirus type 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation. *J. Virol.* **67**, 5226-5234.
- van der Elsen P., de Pater S., Houweling A., van der Veer J., van der Eb A. (1982). The relationship between region E1a and E1b of human adenoviruses in cell transformation. *Gene* **18**, 175-185.
- Vasey P., Shulman L., Gore M., Kirn D. (2000). Phase I trial of intraperitoneal Onyx-015 adenovirus in patients with recurrent ovarian carcinoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* **19**, 1512.
- Vassilev A., Yamauchi J., Kotani T., Prives C., Avantaggiati M. L., Qin J., Nakatani Y. (1998). The 400 kDa subunit of the P/CAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol. Cell* **2**, 869-875.
- Vogelstein B., Kinzler K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**, 523-526.
- Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578.
- Wagner A. J., Kokontis J. M., Hay N. (1994). MYC-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21^{waf1/cip1}. *Genes Dev.* **8**, 2817-2830.
- Waldman T., Kinzler K. W., Vogelstein B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G₁ arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 5187-5190.

- Walker T. A., Wilson B. A., Lewis Jr. A. M., Cook J. L. (1991). E1A oncogene induction of cytolytic susceptibility eliminates sarcoma cell tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6491-6495.
- Wang H. G., Rikitake Y., Carter M. C., Yaciuk P., Abraham S. E., Zerler B., Moran E. (1993). Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J. Virol.* **67**, 476-488.
- Wang X. W., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V., Egly J. M., Wang Z., Freidberg E. C., Evans M. K., Taffe B. G., et al. (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* **10**, 188-195.
- Wang Y. H., Tsay Y. G., Tan B. C., Lo W. Y., Lee S. C. (2003). Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J. Biol. Chem.* **278**, 25568-25576.
- Wang Z. G., Delva L., Gaboli M., Rivi R., Giorgio M., Cordon-Cardo C., Grosveld F., Pandolfi P. P. (1998a). Role of Pml in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* **279**, 1547-1551.
- Wang Z. G., Ruggero D., Ronchetti S., Zhong S., Gaboli M., Rivi R., Pandolfi P. P. (1998b). Pml is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat. genet.* **20**, 266-272.
- Weinberg D. H., Ketner G. (1983). A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5383-5386.
- Weis K., Rambaud S., Lavau C., Jansen J., Carvalho T., Carmo-Fonseca M., Lamond A., Dejean A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR α in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* **76**, 345-356.
- Weissker S. N., Müller B. F., Homfeld A., Deppert W. (1992). Specific and complex interactions of murine p53 with DNA. *Oncogene* **7**, 1921-1932.
- Werness B. A., Levine A. J., Howley P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**, 76-79.
- Wienzek S., Roth J., Dobbstein M. (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J. Virol.* **74**, 193-202.
- Wienzek S., Dobbstein M. (2001). Viral and cellular factors that target the promyelocytic leukemia oncogenic domains strongly activate a glucocorticoid-responsive promoter. *J. Virol.* **75**, 5391-5397.
- Williams J. F., Zhang Y., Williams M. A., Hou S., Kushner D., Riccardi R. (2004). E1A-based determinants of oncogenicity in human adenovirus groups A and C. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**, 245-288.
- White E., Grodzicker T., Stillman B. W. (1984). Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA. *J. Virol.* **52**, 410-419.
- White E., Sabbatini P., Debbas M., Wold W. S., Kusher D. I., Gooding L. R. (1992). The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor α . *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2570-2580.
- Whyte P., Ruley H. E., Harlow E. (1988). Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* **62**, 257-265.
- Whyte P., Williamson N. M., Harlow E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**, 67-75.

- Wold W. S., Tollefson A. E., Hermiston T. W. (Jahr). E3 transcription unit of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 237-274.
- Wolf D., Harris N., Rotter V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a non-producer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* **38**, 119-126.
- Wood M. A., McMahon S. B., Cole M. D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell* **5**, 321-330.
- Wu X., Bayle J. H., Olson D., Levine A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback-loop. *Genes Dev.* **7**, 1126-1132.
- Wulf G. M., Liou Y. C., Ryo A., Lee S. W., Lu K. P. (2002). Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in the response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **277**, 47976-47979.
- Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M. D., Dotsch V., Andrews N. C., Caput D., McKeon F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* **2**, 305-316.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **275**, 1129-1132.
- Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H., Nakatani Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324.
- Yakovleva T., Pramanik A., Kawasaki T., Tan-No K., Gileva I., Lindgren H., Langel U., Ekstrom T. J., Rigler R., Terenius L., Bakalkin G. (2001). p53 latency. C-terminal domain prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J. Biol. Chem.* **276**, 15650-15658.
- Yew P. R., Kao C. C., Berk A. J. (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55k polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* **179**, 795-805.
- Yew P. R., Berk A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B proteins. *Nature* **357**, 82-85.
- Yohn D. S., Hammon W. M., Atchison R. W., Casto B. C. (1968). Oncolytic potentials of nonhuman viruses for human cancer. II. Effects of five viruses on heterotransplantable human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **41**, 523-529.
- Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345-347.
- You L., Yang C. T., Jablons D. M. (2000). ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures of freshly made from lung cancer patients. *Cancer Res.* **60**, 1009-1013.
- Yuan Z. M., Huang Y., Ishiko T., Nakada S., Utsugisawa T., Shioya H., Utsugisawa Y., Yokoyama K., Weichselbaum R., Shi Y., Kufe D. (1999). Role for p300 in stabilization of p53 in the response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **274**, 1883-1886.
- Zacchi P., Gostissa M., Uchida T., Salvagno C., Avolio F., Volinia S., Ronchi Z., Blandino G., Schneider C., Del Sal G. (2002). The prolyl-isomerase Pin-1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853-857.

Zambetti G. P., Bargonetti J., Walker K., Prives C., Levine A. J. (1992). Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev.* **6**, 1143-1152.

Zanema A., Fransen J. A., Davis-Olivier A., Ramaekers F. C., Vooijs G. P., DeLeys B., van der Eb A. J. (1985a). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* **142**, 44-58.

Zanema A., Schrier P. I., Davis-Olivier A., van Laar T., Vaessen R. T., van der Eb A. (1985b). Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3084-3091.

Zeng X., Levine A. J., Lu H. (1998). Non-p53 p53RE binding protein, a human transcription factor functionally analogous to P53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6681-6686.

Zhang Y., Xiong Y., Yarbrough W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: *ARF-INK4a* locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Cell* **92**, 725-734.

Zhang Y., Xiong Y. (1999). Mutations in human *ARF* exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol. Cell* **3**, 579-591.

Zheng H., You H., Zhou X. Z., Murray S. A., Uchida T., Wulf G., Gu L., Tang X., Lu K. P., Xiao Z. X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* **419**, 849-853.

Zheng P., Guo Y., Niu Q., Levy D. E., Dyck J. A., Lu S., Sheiman L. A., Liu Y. (1998). Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature* **396**, 373-376.

Zhu J., Jiang J., Zhou W., Chen X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* **58**, 5061-5065.

Zhu Q., Yao J., Wani G., Wani M. A., Wani A. A. (2001). Mdm2 mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *J Biol. Chem.* **276**, 29695-29701.

Zielinski T., Jordan E. (1969). [Remote results of clinical observation of the oncolytic action of adenoviruses on cervix cancer]. *Nowotwory* **19**, 217-221.

zur Hausen H. (1994). Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. In: zur Hausen H., ed. *Human pathogenic papillomaviruses*. Heidelberg: Springer Verlag, 1994, 131-156.

9. Lebenslauf

ANGABEN ZUR PERSON	
Name	HOBOM, Urs Dominik
Adresse	kleine Ortenberggasse 2, 35039 Marburg, Hessen Institut für Virologie, Raum G9 / AG Dobbeltstein Robert-Koch-Str. 17, 35037 Marburg, Hessen
Telefon	+49 6421 286 3302 (lab) +49 6421 175707 (priv)
Fax	+49 6421 286 8962
E-mail	hobom@tiscali.it
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	12. Jan. 1973
Zivilstand	ledig
ARBEITSERFAHRUNG	
<ul style="list-style-type: none"> • 06.2000 - heute 	<p>Doktorarbeit unter Anleitung von Dr. Matthias Dobbeltstein am Institut für Virologie der Universität Marburg. Konditionell replizierende Adenovirusmutanten und die Interaktion von Adenoviren mit Wirtszellproteinen.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • 03.1998-05.2000 	<p>Forschungsarbeit unter Anleitung von Dr. Ulrich Koszinowski am Institut für Virologie der Universität München. Generierung von Transposoninsertionsmutanten des klonierten human Zytomegalievirusgenoms und deren initiale Charakterisierung.</p>
<ul style="list-style-type: none"> • 07.1996-08.1996(a), • 07.1995-08.1995(b), • 03.1994-04.1994(c), • 07.1993-08.1993(d), • 03.1993-04.1993(e), • 07.1992-08.1992(f). 	<p>Werkstudent am Institut für Virologie in Gießen (a), bei Aventis Pharma, Paris (b,d), bei Bayer Crop Science, Monheim (c), bei Bayer Biotechnology, Wuppertal (e) und bei Bayer Polymers, Dormagen (f). Einsatzbereiche umfaßten die Klonierung von Glykoproteingenen, die stereoselektive Fluorierung von Steroiden, die Proteinaufreinigung mit Sepharosesäulen, die organische Synthese von trisubstituierten Monoaromaten, sowie die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC).</p>

<div>SCHUL- UND BERUFSBILDUNG</div> <div><div><div>• 06.1997-02.1998</div></div></div>	<div>Diplomarbeit im Wahlfach Biochemie unter Anleitung von Dr. Thomas Langer am Institut für Physiologische Chemie der Universität München. Titel: Expression and Charakterisierung des ORF <i>YBP4</i> der Hefe <i>S. cerevisiae</i>, eines putativen Chaperons.</div>
<div><div><div>• 05.1997: 15. Mai</div><div>• 11.1994-05.1997</div></div></div>	<div>Diplomchemiker-Hauptprüfung in den Fächern Biochemie, Organische Chemie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie. Note: Sehr gut.</div> <div>Chemiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Bayern.</div>
<div><div><div>• 10.1994: 27. Okt.</div><div>• 11.1992-10.1994</div></div></div>	<div>Diplomchemiker-Vorprüfung Note: Gut.</div> <div>Grundstudium (Chemie) an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Bayern.</div>
<div><div><div>• 06.1992: 26. Jun.</div><div>• 09.1979-06.1992</div></div></div> <div><div>SPRACHEN</div><div>MUTTERSPRACHE</div><div>SONSTIGE SPRACHEN</div><div><div>• Lesen</div><div>• Schreiben</div><div>• Sprechen</div></div></div>	<div>Abiturprüfung an der Liebig-Schule Gießen, Hessen. Note: 1,1 (best 5%).</div> <div>Verschiedene Schulen (5) alle im Bundesgebiet.</div> <div><div>DEUTSCH</div><div><div>Englisch</div><div>-Französisch</div><div>-Italienisch</div><div>-Portugiesisch</div><div>-Spanisch</div></div><div><div>exzellent</div><div>-exzellent</div><div>- sehr gut</div><div>- sehr gut</div><div>- ausreichend.</div></div><div><div>exzellent</div><div>- sehr gut</div><div>- gut</div><div>- gut</div><div>- ausreichend.</div></div><div><div>exzellent</div><div>- exzellent</div><div>- sehr gut</div><div>- sehr gut</div><div>- ausreichend.</div></div></div>
<div>REFERENZEN</div>	<div>PD Dr. Matthias Dobbeltstein, Institut für Virologie, Robert-Koch-Str. 17, 35037 Marburg, Hessen, Tel. +49 6421 286 4318, Fax +49 6421 286 8962, mail: dobbelst@mail.uni-marburg.de.</div> <div>PD Dr. Gabriele Hahn, Pettenkofer Institut, Pettenkofer Str. 9a, 80336 München, Bayern, Tel. +49 89 5160 5270, Fax +49 89 5160 5292, mail: ghahn@m3401.mpk.med.uni-muenchen.de.</div> <div>Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk, Institut für Virologie, Robert-Koch-Str. 17, 35037 Marburg, Hessen, Tel. +49 6421 286 6899 or ... 6254, Fax +49 6421 286 8962, mail: klenk@staff.uni-marburg.de.</div>

PUBLIKATIONSLISTE

HOBOM U, DOBBELSTEIN M.

Despite its accumulation, p53 remains transcriptionally inactive in E1B-mutant adenovirus infected cells.

[J. VIROL., UNTER REVIEW]

KOCH P, GATFIELD J, LOBER C, HOBOM U, LENZ-STOPPLER C, ROTH J, DOBBELSTEIN M.

Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and non-degradable p53.

CANCER RES. 2001 AUG 1;61(15):5941-5947.

HOBOM U, BRUNE W, MESSERLE M, HAHN G, KOSZINOWSKI UH.

Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes.

J VIROL. 2000 SEP;74(17):7720-7729.

ANGULO A, KERRY D, HUANG H, BORST EM, RAZINSKY A, WU J, HOBOM U, MESSERLE M, GHAZAL P.

Identification of a boundary domain adjacent to the potent human cytomegalovirus enhancer that represses transcription of the divergent UL127 promoter.

J VIROL. 2000 MAR;74(6):2826-2839.

BRUNE W, MENARD C, HOBOM U, ODENBREIT S, MESSERLE M, KOSZINOWSKI UH.

Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis.

NAT BIOTECHNOL. 1999 APR;17(4):360-364

.

BEITRÄGE ZU
WISSENSCHAFTLICHEN
KONGRESSEN

HOBOM U, DOBBELSTEIN M.

The Deletion of the E1B-19k ORF Renders Adenovirus Replication sensitive to P53.

03.2003 JAHRESTAGUNG DER GESELLSCHAFT FÜR VIROLOGIE – MÜNDLICH

HOBOM U, DOBBELSTEIN M.

Deletion of E1B-19k Renders Adenovirus Replication Sensitive to p53.

08.2002 INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SCIENCES – MÜNDLICH

HOBOM U, BRUNE W, MESSERLE M, KOSZINOWSKI U.

Rapid Screening Procedure of Random Transposon Libraries of Cloned Herpesvirus Genomes.

05.2000 JAHRESTAGUNG DER GESELLSCHAFT FÜR VIROLOGIE - POSTER

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer, Dr. Matthias Dobbstein, für die großzügige Unterstützung bedanken, die ich während der langen Zeit immer wieder erfahren durfte. Danke für die Bereitstellung des Themas, für die ‚Jour fixes‘ als stets stimulierende Anleitung und Diskussion. Natürlich möchte ich mich auch bedanken für all das, was ich über die Jahre hinweg lernen durfte, die Reagenzien, die ich benutzen durfte, sowie für jegliche Form von Kritik.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Klenk, an dessen Institut ich diese Arbeiten durchführen durfte, für die freundliche Aufnahme und die vielfältigen Möglichkeiten, die mir dieses Institut immer wieder geboten hat. Auch möchte ich mich bei Ihm für die Durchsicht der Arbeit bedanken, sowie die stets entspannenden Ruderausflüge auf der Lahn mit anschließender Grillfeier im Hause Klenk.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Mohamed Marahiel für die Annahme als Doktorand der Chemie sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle auch einmal bei meinen Kollegen bedanken, für das, was wir zusammen unternommen haben, und all das, was dazu beigetragen hat, meine Arbeit in einer angenehmen, ja teils sogar lustigen, Atmosphäre durchführen zu können. Also: Vielen Dank Michael Schümann, Christoph Dohmesen, Markus Kleinschmitt, Germán Horn, Angelika Waltermann, Claudia Lenz-Bauer, Natalia Kartasheva und Constanze Möritz. Auch unsere sehr zahlreichen Praktikanten waren stets eine angenehme Bereicherung für das Labor, ganz besonders fleißig waren meine beiden Praktikanten Christoph Dohmesen und Silke Arzberger. Bei Philipp Koch, Christian Löber, Ana Contente und Kristina Löhr möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung stets gefördert und vielfach unterstützt haben.